

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS
DER MILCHLEISTUNG AUF DEN
PYRIMIDIN- UND PURINSTOFFWECHSEL
DER RINDERMILCHDRÜSE**

MANFRED STOHRER

Disbui. München
1987



Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und
Ernährungsphysiologie der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. D. Giesecke

Untersuchungen über den Einfluß der
Milchleistung auf den
Pyrimidin-und Purinstoffwechsel
der Rindermilchdrüse

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Manfred Stohrer
aus
Göppingen

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. D. Giesecke

Korreferent: Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	Grundlagen der Statistik	2
1.2.	Statistische Methoden	3
1.3.	Statistische Software	4
1.4.	Statistische Inferenz	5
1.5.	Statistische Hypothesenprüfung	6
1.6.	Statistische Regression	7
1.7.	Statistische Zeitreihenanalyse	8
1.8.	Statistische Qualitätskontrolle	9
1.9.	Statistische Simulation	10
1.10.	Statistische Datenvisualisierung	11
1.11.	Statistische Experimentaldesigns	12
1.12.	Statistische Modellierung	13
1.13.	Statistische Netzwerke	14
1.14.	Statistische Optimierung	15
1.15.	Statistische Machine Learning	16
1.16.	Statistische Deep Learning	17
1.17.	Statistische Reinforcement Learning	18
1.18.	Statistische Generative Models	19
1.19.	Statistische Natural Language Processing	20
1.20.	Statistische Computer Vision	21
1.21.	Statistische Robotics	22
1.22.	Statistische Healthcare	23
1.23.	Statistische Finance	24
1.24.	Statistische Marketing	25
1.25.	Statistische Law	26
1.26.	Statistische Education	27
1.27.	Statistische Environment	28
1.28.	Statistische Energy	29
1.29.	Statistische Transportation	30
1.30.	Statistische Agriculture	31
1.31.	Statistische Manufacturing	32
1.32.	Statistische Construction	33
1.33.	Statistische Infrastructure	34
1.34.	Statistische Urban Planning	35
1.35.	Statistische Public Health	36
1.36.	Statistische Social Science	37
1.37.	Statistische History	38
1.38.	Statistische Art	39
1.39.	Statistische Music	40
1.40.	Statistische Literature	41
1.41.	Statistische Philosophy	42
1.42.	Statistische Religion	43
1.43.	Statistische Ethics	44
1.44.	Statistische Politics	45
1.45.	Statistische Economics	46
1.46.	Statistische Sociology	47
1.47.	Statistische Anthropology	48
1.48.	Statistische Linguistics	49
1.49.	Statistische Psychology	50
1.50.	Statistische Neuroscience	51
1.51.	Statistische Medicine	52
1.52.	Statistische Dentistry	53
1.53.	Statistische Veterinary Medicine	54
1.54.	Statistische Agriculture	55
1.55.	Statistische Forestry	56
1.56.	Statistische Fisheries	57
1.57.	Statistische Wildlife Management	58
1.58.	Statistische Conservation	59
1.59.	Statistische Environmental Science	60
1.60.	Statistische Earth Science	61
1.61.	Statistische Geology	62
1.62.	Statistische Meteorology	63
1.63.	Statistische Climatology	64
1.64.	Statistische Oceanography	65
1.65.	Statistische Atmospheric Science	66
1.66.	Statistische Space Science	67
1.67.	Statistische Planetary Science	68
1.68.	Statistische Astrophysics	69
1.69.	Statistische Cosmology	70
1.70.	Statistische Particle Physics	71
1.71.	Statistische Nuclear Physics	72
1.72.	Statistische Quantum Physics	73
1.73.	Statistische Relativity	74
1.74.	Statistische Cosmology	75
1.75.	Statistische Astrophysics	76
1.76.	Statistische Particle Physics	77
1.77.	Statistische Nuclear Physics	78
1.78.	Statistische Quantum Physics	79
1.79.	Statistische Relativity	80
1.80.	Statistische Cosmology	81
1.81.	Statistische Astrophysics	82
1.82.	Statistische Particle Physics	83
1.83.	Statistische Nuclear Physics	84
1.84.	Statistische Quantum Physics	85
1.85.	Statistische Relativity	86
1.86.	Statistische Cosmology	87
1.87.	Statistische Astrophysics	88
1.88.	Statistische Particle Physics	89
1.89.	Statistische Nuclear Physics	90
1.90.	Statistische Quantum Physics	91
1.91.	Statistische Relativity	92
1.92.	Statistische Cosmology	93
1.93.	Statistische Astrophysics	94
1.94.	Statistische Particle Physics	95
1.95.	Statistische Nuclear Physics	96
1.96.	Statistische Quantum Physics	97
1.97.	Statistische Relativity	98
1.98.	Statistische Cosmology	99
1.99.	Statistische Astrophysics	100
2.	Statistische Inferenz	101
2.1.	Statistische Hypothesenprüfung	102
2.2.	Statistische Regression	103
2.3.	Statistische Zeitreihenanalyse	104
2.4.	Statistische Qualitätskontrolle	105
2.5.	Statistische Simulation	106
2.6.	Statistische Datenvisualisierung	107
2.7.	Statistische Experimentaldesigns	108
2.8.	Statistische Modellierung	109
2.9.	Statistische Netzwerke	110
2.10.	Statistische Optimierung	111
2.11.	Statistische Machine Learning	112
2.12.	Statistische Deep Learning	113
2.13.	Statistische Reinforcement Learning	114
2.14.	Statistische Generative Models	115
2.15.	Statistische Natural Language Processing	116
2.16.	Statistische Computer Vision	117
2.17.	Statistische Robotics	118
2.18.	Statistische Healthcare	119
2.19.	Statistische Finance	120
2.20.	Statistische Marketing	121
2.21.	Statistische Law	122
2.22.	Statistische Education	123
2.23.	Statistische Environment	124
2.24.	Statistische Energy	125
2.25.	Statistische Transportation	126
2.26.	Statistische Agriculture	127
2.27.	Statistische Forestry	128
2.28.	Statistische Fisheries	129
2.29.	Statistische Wildlife Management	130
2.30.	Statistische Conservation	131
2.31.	Statistische Environmental Science	132
2.32.	Statistische Earth Science	133
2.33.	Statistische Geology	134
2.34.	Statistische Meteorology	135
2.35.	Statistische Climatology	136
2.36.	Statistische Oceanography	137
2.37.	Statistische Atmospheric Science	138
2.38.	Statistische Space Science	139
2.39.	Statistische Planetary Science	140
2.40.	Statistische Astrophysics	141
2.41.	Statistische Cosmology	142
2.42.	Statistische Particle Physics	143
2.43.	Statistische Nuclear Physics	144
2.44.	Statistische Quantum Physics	145
2.45.	Statistische Relativity	146
2.46.	Statistische Cosmology	147
2.47.	Statistische Astrophysics	148
2.48.	Statistische Particle Physics	149
2.49.	Statistische Nuclear Physics	150
2.50.	Statistische Quantum Physics	151
2.51.	Statistische Relativity	152
2.52.	Statistische Cosmology	153
2.53.	Statistische Astrophysics	154
2.54.	Statistische Particle Physics	155
2.55.	Statistische Nuclear Physics	156
2.56.	Statistische Quantum Physics	157
2.57.	Statistische Relativity	158
2.58.	Statistische Cosmology	159
2.59.	Statistische Astrophysics	160
2.60.	Statistische Particle Physics	161
2.61.	Statistische Nuclear Physics	162
2.62.	Statistische Quantum Physics	163
2.63.	Statistische Relativity	164
2.64.	Statistische Cosmology	165
2.65.	Statistische Astrophysics	166
2.66.	Statistische Particle Physics	167
2.67.	Statistische Nuclear Physics	168
2.68.	Statistische Quantum Physics	169
2.69.	Statistische Relativity	170
2.70.	Statistische Cosmology	171
2.71.	Statistische Astrophysics	172
2.72.	Statistische Particle Physics	173
2.73.	Statistische Nuclear Physics	174
2.74.	Statistische Quantum Physics	175
2.75.	Statistische Relativity	176
2.76.	Statistische Cosmology	177
2.77.	Statistische Astrophysics	178
2.78.	Statistische Particle Physics	179
2.79.	Statistische Nuclear Physics	180
2.80.	Statistische Quantum Physics	181
2.81.	Statistische Relativity	182
2.82.	Statistische Cosmology	183
2.83.	Statistische Astrophysics	184
2.84.	Statistische Particle Physics	185
2.85.	Statistische Nuclear Physics	186
2.86.	Statistische Quantum Physics	187
2.87.	Statistische Relativity	188
2.88.	Statistische Cosmology	189
2.89.	Statistische Astrophysics	190
2.90.	Statistische Particle Physics	191
2.91.	Statistische Nuclear Physics	192
2.92.	Statistische Quantum Physics	193
2.93.	Statistische Relativity	194
2.94.	Statistische Cosmology	195
2.95.	Statistische Astrophysics	196
2.96.	Statistische Particle Physics	197
2.97.	Statistische Nuclear Physics	198
2.98.	Statistische Quantum Physics	199
2.99.	Statistische Relativity	200

Meinen Eltern

1.	Einleitung	1
1.1.	Grundlagen der Statistik	2
1.2.	Statistische Methoden	3
1.3.	Statistische Software	4
1.4.	Statistische Inferenz	5
1.5.	Statistische Hypothesenprüfung	6
1.6.	Statistische Regression	7
1.7.	Statistische Zeitreihenanalyse	8
1.8.	Statistische Qualitätskontrolle	9
1.9.	Statistische Simulation	10
1.10.	Statistische Datenvisualisierung	11
1.11.	Statistische Experimentaldesigns	12
1.12.	Statistische Modellierung	13
1.13.	Statistische Netzwerke	14
1.14.	Statistische Optimierung	15
1.15.	Statistische Machine Learning	16
1.16.	Statistische Deep Learning	17
1.17.	Statistische Reinforcement Learning	18
1.18.	Statistische Generative Models	19
1.19.	Statistische Natural Language Processing	20
1.20.	Statistische Computer Vision	21
1.21.	Statistische Robotics	22
1.22.	Statistische Healthcare	23
1.23.	Statistische Finance	24
1.24.	Statistische Marketing	25
1.25.	Statistische Law	26
1.26.	Statistische Education	27
1.27.	Statistische Environment	28
1.28.	Statistische Energy	29
1.29.	Statistische Transportation	30
1.30.	Statistische Agriculture	31
1.31.	Statistische Forestry	32
1.32.	Statistische Fisheries	33
1.33.	Statistische Wildlife Management	34
1.34.	Statistische Conservation	35
1.35.	Statistische Environmental Science	36
1.36.	Statistische Earth Science	37
1.37.	Statistische Geology	38
1.38.	Statistische Meteorology	39
1.39.	Statistische Climatology	40
1.40.	Statistische Oceanography	41
1.41.	Statistische Atmospheric Science	42
1.42.	Statistische Space Science	43
1.43.	Statistische Planetary Science	44
1.44.	Statistische Astrophysics	45
1.45.	Statistische Cosmology	46
1.46.	Statistische Particle Physics	47
1.47.	Statistische Nuclear Physics	48
1.48.	Statistische Quantum Physics	49
1.49.	Statistische Relativity	50
1.50.	Statistische	

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Grundzüge des Pyrimidin- und Purinstoff- wechsels der Rindermilchdrüse	2
1.1.1.	Pyrimidinstoffwechsel	4
1.1.2.	Purinstoffwechsel	11
1.1.3.	Seltene Basen	15
1.2.	Problemstellung	18
2.	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1.	Versuchstiere, Haltung und Fütterung	20
2.2.	Milchleistung, Zahl der Laktationen, Laktationsstadium, Milchprotein und -fett	24
2.3.	Probengewinnung und -aufbereitung	28
2.4.	Analytische Methoden	29
2.4.1.	Entwicklung der analytischen Methode	30
2.4.2.	Bestimmung der Pyrimidine und Purine in der Milch	32
2.4.3.	Prüfung der methodischen Bedingungen	39
2.5.	Auswertung	41
2.5.1.	Berechnung der Konzentrationen in der Milch und der Ausscheidungsmengen über die Milch	41
2.5.2.	Statistische Methoden	42

3.	ERGEBNISSE	43
3.1.	Pyrimidinverbindungen	43
3.1.1.	Orotsäure	43
3.1.2.	Uridin	54
3.1.3.	Cytidin	64
3.2.	Purine und Purinmetaboliten	68
3.2.1.	Hypoxanthin und Xanthin	68
3.2.2.	Harnsäure	70
3.2.3.	Allantoin	79
3.3.	seltene Basen, seltene Nucleoside und weitere Pyrimidine und Purine	86
3.4.	Übersicht über die Pyrimidine und Purine in der Rindermilch	90
3.5.	Kreatinin	93
3.6.	Hippursäure	95
4.	DISKUSSION	96
4.1.	Erläuterung möglicher Zusammenhänge zwischen der Konzentration von Metaboliten in der Milch und der Milchleistung	96
4.2.	Einflüsse auf die Orotsäuresynthese in der Milchdrüse	101
4.3.	Zusammenhang zwischen Pyrimidin- und Purinmetaboliten der Milchdrüse	106
4.4.	Über die Schlüsselfunktion der Glucose im Stoffwechsel der Rindermilchdrüse	108
4.5.	Einflüsse auf die Allantoinkonzentration in der Milch	111
4.6.	Beurteilung des Hippursäuregehaltes der Milch	114
4.7.	Schlußfolgerung	115

5.	ZUSAMMENFASSUNG	117
	SUMMARY	119
6.	LITERATURVERZEICHNIS	121

1. EINLEITUNG

Eine Kuh mit einer Milchleistung von 30 kg/Tag gibt 1.05 kg Protein pro Tag über die Milch ab (mittlerer Proteingehalt von 3.5% (g/100g) in der Milch). Das Milchprotein setzt sich aus etwa 80% Casein, 10% β -Lactoglobulin, 4% α -Lactalbumin, 4% α -Globulin, 1% Serumalbumin und 1% Immunglobulinen zusammen (Kirchmeier, 1968). Während das Serumalbumin und die Immunglobuline aus dem Blut stammen, werden 98% der Proteine in den Milchdrüsenzellen synthetisiert.

Der für die Biosynthese der Proteine notwendige Nucleinsäureumsatz ist bisher noch wenig quantifiziert. Für solche Studien ist die Milchdrüse besonders geeignet, denn Substrataufnahmen und Syntheseraten lassen sich bei der Milchdrüse experimentell einfacher bestimmen als bei anderen Organen. Über die Erfassung von arterio-venösen Differenzen und gleichzeitiger Messung des Blutflusses durch die Milchdrüse läßt sich am lebenden Tier die Aufnahme von Substraten berechnen. Die Produkte können über die Milch quantifiziert werden (Bickerstaffe et al., 1974).

Ein erster Schritt, die Rate der Nucleinsäuresynthese und -ausscheidung und den Anteil des Salvage-Weges für die Pyrimidin- und Purinkörper zu charakterisieren, ist die Bestimmung der Pyrimidine und Purine, die über die Milch ausgeschieden werden.



1.1. Grundzüge des Pyrimidin- und Purinstoffwechsels der Rindermilchdrüse

In allen Zellen steuert die in der Desoxyribonucleinsäure, DNS, gespeicherte genetische Information die Synthese von Proteinen, und die Ribonucleinsäure, RNS, übermittelt dabei die Informationen. Die Nucleinsäuren sind Biopolymere. Ihre monomeren Bausteine sind die Mononucleotide, die für die RNS in die Pyrimidinderivate Cytidinmonophosphat und Uridinmonophosphat und die Purinderivate Adenosinmonophosphat und Guanosinmonophosphat eingeteilt werden. In der DNS ist die Pyrimidinbase Uracil durch Thymin ersetzt.

In Abbildung 1 ist der Metabolismus von Nucleinsäuren und Nucleobasen schematisch wiedergegeben. Zuerst wird die DNS-Botschaft in eine RNS-Kopie, die Vorläufer-RNS, transkribiert. Diese wird, bevor sie als funktionsfähige Ribonucleinsäure durch die Kernporen ins Cytoplasma gelangt, noch in komplizierten, Reifung oder englisch "Processing" genannten, Bearbeitungsprozeduren modifiziert. In je nach RNS-Typ unterschiedlichem Ausmaße wird das Primär-Transkript zerschnitten und die Exontranskripte werden wieder verknüpft. Daneben werden auch einzelne Nucleobasen verändert. Es entstehen die, als "seltene Basen" bezeichneten, meist methylierten Pyrimidin- und Purinderivate.

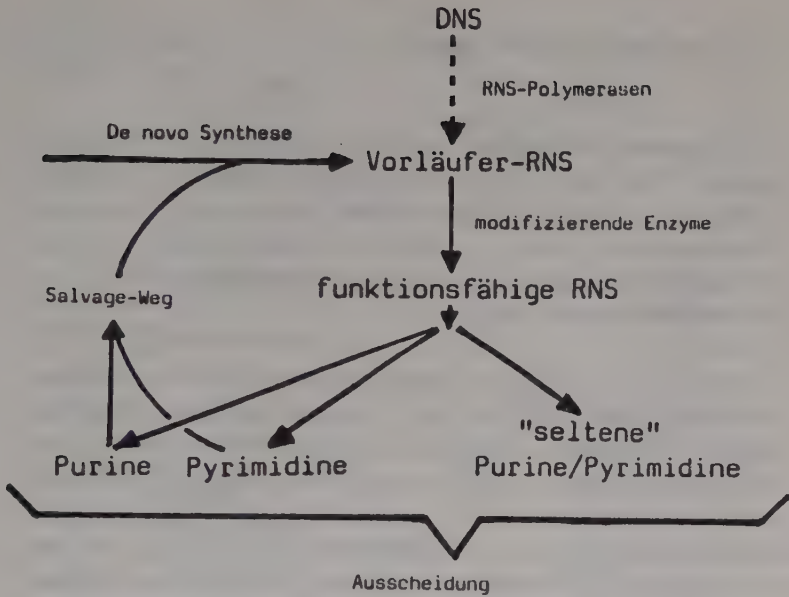


Abbildung 1: Grundzüge des Stoffwechsels von Nucleinsäuren und Nucleobasen (schematisch, umgezeichnet nach Schöch et al., 1977)

Die beim Abbau der Nucleinsäuren freiwerdenden unveränderten Pyrimidine und Purine werden entweder weiter abgebaut oder über den sogenannten Salvage-Weg, wenn ein Bedarf und genügend Energie in Form von Glucose vorhanden sind, wiederverwendet. Im Gegensatz dazu lassen sich die modifizierten Nucleobasen und Nucleoside nicht wiederverwenden und werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden.

1.1.1. Pyrimidinstoffwechsel

Die Standard-Pyrimidinbasen sind Cytosin, Uracil und Thymin. Die abgeleiteten Nucleoside heißen Cytidin, Uridin und Thymidin. Neben ihrer Bedeutung als Nucleinsäurenbausteine sind Cytidintriphosphat und Uridintriphosphat Coenzyme der Phosphatidbiosynthese bzw. des Kohlenhydratstoffwechsels.

Im Gegensatz zur Purinsynthese wird bei der Pyrimidinsynthese (Abbildung 2) mit dem Aufbau des Pyrimidinringes begonnen. Das erste spezifische Enzym der Pyrimidinsynthese, die cytosolisch lokalisierte Carbamylphosphatsynthetase II, katalysiert die Synthese von Carbamylphosphat aus Kohlendioxid und dem Amid-N des Glutamins unter Verbrauch von 2 Mol ATP pro Mol synthetisiertem Carbamylphosphat. Diese Verbindung mit hohem Gruppenübertragungspotential kondensiert mit Aspartat unter Katalyse der Aspartattranscarbamylase zu Carbamylaspartat. Durch Wasserabspaltung zwischen dem N-Atom 1 und dem C-Atom 6 des Carbamylaspartates katalysiert die Dihydroorotase den Ringschluß zum Dihydroorotat. Die oben aufgeführten ersten drei Enzyme der Pyrimidinsynthese bilden einen Enzymkomplex, der aus einer einzigen Peptidkette besteht. Dies hat den Vorteil, daß die Zwischenprodukte effizient von einem zum nächsten Enzym übertragen werden (Robinson, 1980).

Dihydroorotat diffundiert durch die äußere Mitochondrienmembran zur Dihydroorotatdehydrogenase, welche an die äußere Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran gebunden ist. Ihr Reaktionsprodukt, die Orotsäure diffundiert zurück ins Cytoplasma. Bei physiologischen pH-Werten liegt die Orotsäure (pks : 2.4) überwiegend

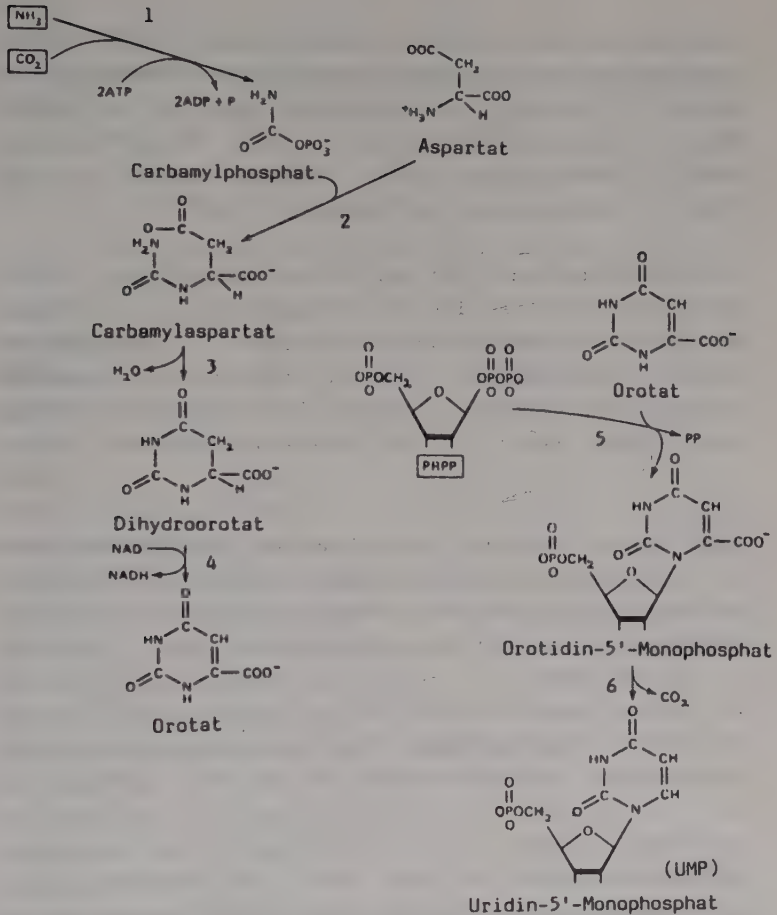


Abbildung 2: Reaktionssequenz der Pyrimidinbiosynthese (nach Robinson, 1980)

- 1: Carbamylphosphat-Synthetase II (EC 6.3.4.16)
- 2: Aspartat-Transcarbamylase (EC 2.1.3.2)
- 3: Dihydrooorotase (EC 3.5.2.3)
- 4: Dihydrooorotat-Oxidase (EC 1.3.3.1)
- 5: Orotat-Phosphoribosyl-Transferase (EC 2.4.2.10)
- 6: Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase (EC 4.1.1.23)

dissoziiert, das heißt als Orotat vor. An einem zweiten Enzymkomplex aus Orotatphosphoribosyltransferase und Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase entsteht aus Orotat über Orotidin-5'-Monophosphat als Zwischenprodukt Uridin-5'-Monophosphat (UMP). Dieses ist die Vorstufe aller Pyrimidinnucleotide (Robinson, 1980)

Auch für Pyrimidine gibt es einen Salvage-Weg. Uridin kann unter Katalyse der Uridinkinase (EC 2.7.1.48) oder der Orotat-Phosphoribosyl-Transferase zu Uridinmonophosphat phosphoryliert werden. Weitere Salvage-Enzyme sind die Thymidinkinase (EC 2.7.1.21) und die Desoxycytidinkinase (EC 2.7.1.74) (Peters und Veerkamp, 1982).

Unter den Purinen und Pyrimidinen der Rindermilch steht die Orotsäure im Mittelpunkt des allgemeinen Interesses. Obgleich ihre einzige bekannte Funktion die eines Zwischenproduktes der Pyrimidinsynthese ist, liegt sie in der Kuhmilch in einer Konzentration von etwa 500 $\mu\text{mol/l}$ vor. Ihr Vorkommen ist so charakteristisch, daß sie sogar zum Nachweis von Milchpulveranteilen in Lebensmitteln vorgeschlagen wurde (Plasser, 1985).

Von allen bisher untersuchten Spezies ist die Orotsäurekonzentration in der Milch des Rindes besonders hoch (vergleiche Tabelle 1). Nach ihrer Entdeckung in der Rindermilch (Biscaro und Belloni, 1905) wurde ihre Existenz lange Zeit verdrängt, da bekannt wurde, daß sie bei Ratten Fettlebern verursacht (Standerfer und Handler, 1955). Während sich für den Menschen eine nachteilige Wirkung als Bestandteil von Nahrungsmitteln nicht nachweisen ließ (Durschlag und Robinson, 1980 a; Durschlag und Robinson, 1980 b), konnten einige positive Effekte aufgedeckt werden (Cihak und Reutter, 1980).

Tabelle 1: Orotsäuregehalt in der Milch unterschiedlicher Spezies (nach Larson und Hegarty, 1979)

Spezies	n	Orotsäure $\mu\text{mol/l}$
Mensch	(3)	< 7
Hauskaninchen	(5)	< 7
Hauskatze	(5)	< 7
Kamel	(1)	< 7
Alpaka	(2)	< 7
Schwein	(2)	< 7
	(5)	$32^* \pm 19$
Meerschweinchen	(2)	7
	(1)	115*
Pferd	(4)	13 ± 13
Gazelle	(1)	26
Ratte	(16)	58 ± 32
Ziege	(6)	83 ± 45
Schaf	(9)	167 ± 58
Giraffe	(1)	186
Wasserbüffel	(1)	186
Rothirsch	(1)	314
Elch	(3)	423 ± 102
Rind (Fleischrasse)	(5)	487 ± 108
Rind (Milchrasse)	(8)	564 ± 122
	(4)	$135^* \pm 45$

* Kolostrum

Robinson (1980) beschrieb die Abhängigkeit der Orotsäurekonzentration in der Rindermilch von individuellen Variationen, Laktationsstadium, Rasse und Zahl der Laktationen. Die Orotsäurekonzentration im Kolostrum von 14 Holsteinkühen betrug im Mittel $53 \mu\text{mol/l}$, stieg mit zunehmender Laktationsdauer an und blieb nach der zehnten Woche bis nahe an das Laktationsende auf einem konstanten Niveau von durchschnittlich $487 \mu\text{mol/l}$. Die Milch von Guernsey- und Jerseykühen enthielt weniger Orotsäure als die Milch von Holstein-, Brown-Swiss- und Ayrshirekühen.

Um die Ursache der hohen Orotsäurekonzentration in der Rindermilch zu finden, wurden die Enzymaktivitäten des Pyrimidinsyntheseweges untersucht. Dabei fand Vekich (1973) die in Tabelle 2 aufgeführten Besonderheiten der Carbamylphosphatsynthetase der Rindermilchdrüse.

Die Carbamylphosphatsynthetase I (EC 6.3.4.16), die mitochondrial lokalisiert ist und deren Substrat Ammoniak ist, kommt in hoher Aktivität lediglich in der Leber vor. Sie ist ein Enzym des Harnstoffzyklus. Die Carbamylphosphatsynthetase II (EC 6.3.5.5) kommt in allen Geweben vor, befindet sich im Cytosol und hydrolysiert Glutamin. Sie katalysiert in allen Geweben die Carbamylphosphatsynthese für den Pyrimidinstoffwechsel (Vekich et al., 1973).

Tabelle 2: Vergleich von Carbamylphosphatsynthetase aus laktierendem Rindermilchdrüsenngewebe mit CPS I aus Rattenleber und CPS II aus Mäusemilz (nach Vekich et al., 1973):

Faktor	CPS I	CPS II	CPS Milchdr.
<u>Substrate</u>			
L-Glutamin	0	+++	+
Ammonium	+++	+	+++
	Km (mmol/l)		
	1-2		13.7
ATP	4-5	3	4.2
Karbonat	0.5-3	10	1.1
<u>Aktivatoren und Inhibitoren</u>			
PRPP	0	+	+
N-Acetyl-			
L-Glutamat	notwendig	0	0
UTP	0	-	-
Kalium	+	notwendig	+
	(bei niedrigem NH ₄ ⁺ -Spiegel)		(bei niedrigem NH ₄ ⁺ -Spiegel)
<u>spezifische Aktivität (μmol/hr/g Gewebe)</u>			
	599	0.90	0.14

CPS I in anderen Säugerlebern: 213 - 2800 μmol/hr/g

CPS II in anderen unterschiedlichen Säugergeweben: 0.01-
0.8 μmol/hr/g

Chen und Larson (1971) untersuchten die Aktivitäten der Dihydroorotatoxidase, Orotat-Phosphoribosyltransferase und der Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase in der Rindermilchdrüse und fanden bei allen drei untersuchten Enzymen höhere spezifische Aktivitäten als in der Rattenmilchdrüse. Die hohe Orotsäurekonzentration in der Kuhmilch kann also nicht durch das Fehlen der Enzymaktivitäten der Pyrimidinsynthese nach der Orotsäure erklärt werden. Weder die Untersuchungen von Grummer und Larson (1980), die zeigen, daß die Lokalisation der Enzyme der Pyrimidinsynthese der Rindermilchdrüse sich nicht von der anderer Gewebe unterscheidet, noch Enzymhemmungsversuche der Pyrimidinsynthese aus Orotsäure (Robinson und Larson, 1974) konnten die Frage nach der Ursache der hohen Orotsäurekonzentration in der Rindermilch beantworten. Sie ist bis heute ungeklärt.

Über weitere Pyrimidine in der Rindermilch gab es bisher nur wenige Untersuchungen. Denamur (1959) und Johke (1962) wiesen Cytidin-Monophosphat nach. Rashid (1976) fand Uridin-Monophosphat neben Orotsäure und Cytidin-Monophosphat in der Kuhmilch.

1.1.2. Purinstoffwechsel

In den Nucleinsäuren kommen die Purinbasen Adenin und Guanin vor. Ihre Nucleoside Adenosin bzw. Guanosin enthalten in der Desoxyribonucleinsäure 2'-Desoxyribose und in den Ribonucleinsäuren Ribose als Zuckeranteil. Sie sind außerdem noch als Bestandteile vieler Coenzyme und energiereicher Triphosphate von Bedeutung. Nucleotide nennt man die entsprechenden 5'-Phosphorsäureester der Nucleoside.

Purine können ausgehend von Phosphoribosylpyrophosphat, PRPP, de novo synthetisiert werden. Dabei wird der Purinring aus einfachen Vorstufen, die im Citratzyklus anfallen, aufgebaut. Endprodukt der Purinsynthese ist Inosinmonophosphat, von dem ausgehend die anderen Purinnucleotide synthetisiert werden. Da die Purinsynthese de novo bis zum AMP sechs ATP, die Bildung von PRPP eingerechnet, kostet, ist die Wiederverwendung der Purinbasen Adenin, Guanin und Hypoxanthin über den Salvage-Weg, bei dem nur zwei ATP für die PRPP-Synthese aufgewendet werden müssen, eine wertvolle, energiesparende Einrichtung des Organismus.

Adenosin wird über Inosin zu Hypoxanthin abgebaut. Aus Guanosin entsteht über Guanin Xanthin. Die Xanthinoxidase oxydiert Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure. Säugetiere können, mit Ausnahme der anthropoiden Primaten und des Dalmatinerhundes (Giesecke et al., 1985), Harnsäure mit Hilfe des Leberenzym Uricase zu Allantoin spalten. Dieser gut wasserlösliche Metabolit ist das Endprodukt des Purinstoffwechsels und wird mit dem Harn ausgeschieden. Einen Überblick über den Purinstoffwechsel gibt Watts (1981).

Allantoin stellt das hauptsächliche Endprodukt des Purinabbaus des Wiederkäuers dar. In einer Vielzahl von Untersuchungen wurde ein enger Zusammenhang zwischen der Bildung von Bakterieneiweiß im Pansen und der Allantoinausscheidung über Körperflüssigkeiten festgestellt, (Topps und Elliot, 1965, Laurent und Vignon, 1983) der auf dem hohen Nucleinsäuregehalt von Bakterienzellen (Smith, 1969) beruht.

Laurent und Vignon (1983) verglichen die renale Allantoinausscheidung von laktierenden Ziegen und Ziegenböcken. Die weiblichen Tiere wiesen trotz höherer Energie- und Eiweißaufnahme geringere Werte auf. Daraus läßt sich schließen, daß ein Teil des gebildeten Allantoins über die Milch ausgeschieden wird. Wahrscheinlich spiegelt das Allantoin in der Milch ebenso einen mittleren Gehalt im Blut wieder, wie dies bei der Ausscheidung von Allantoin über den Harn (Kaplan und Pobirskii, 1974) der Fall ist.

Schon 1902 hat Schardinger über das Vorkommen der Xanthinoxidase in der Kuhmilch berichtet. Bei der nach ihm benannten Methode reduziert das Enzym unter Luftabschluß und unter Formaldehydzugabe Methylenblau zum farblosen Leukomethylenblau. Damit kann rohe von gekochter Milch unterschieden werden.

Außer in der Kuhmilch ist Xanthinoxidase-Aktivität in der Milch von

- Schaf, Kaninchen (Modi et al., 1959)
 - Maus, Ratte, Meerschweinchen, Affe, Katze, Hund, Esel, Stute (Zikaris et al., 1977)
 - Ziege und Büffel (Gandhi und Ahuja, 1979)
- nachgewiesen.

In der Humanmilch (Bradley und Gunther, 1960) ist das Enzym zwar vorhanden, aber erst nach mechanischer Behandlung (beispielsweise Schütteln) konnte Xanthinoxidaseaktivität nachgewiesen werden. Die Schweinemilch (Modi et al., 1959) enthält keine Xanthinoxidase.

Neben der Funktion der Xanthinoxidase im Purinstoffwechsel, wo sie die Bildung von Harnsäure aus Hypoxanthin und Xanthin katalysiert, kann sie als nichtspezifisches Enzym weitere Purine, Pyrimidine, Aldehyde, Pteridine und andere heterozyklische Verbindungen oxidieren (Bray, 1975).

Die Xanthinoxidase ist in der Milchdrüsenzelle nicht Bestandteil der Plasmamembran (Jarasch et al., 1977), sondern hauptsächlich im Cytoplasma (Mather et al., 1982) lokalisiert.

In der Kuhmilch ist die Xanthinoxidase vor allem zwischen dem Triglyceridkern des Fettkügelchens und seiner äußeren Membran (Mather et al., 1977) zu finden. Außerdem ist sie Bestandteil der Fettkügelchenmembran (Briley und Eisenthal, 1975) und des Milchserums (Briley und Eisenthal, 1974).

Die Xanthinoxidase-Aktivität der Kuhmilch ist neben individuellen Variationen von Rasse, Laktationsstadium und der Jahreszeit abhängig. Nach Stannard (1975) ist die Aktivität in der Mitte der Laktation um die Hälfte niedriger als am Anfang und am Ende.

Bedenkt man die Lokalisation der Xanthinoxidase in der Milch und ihre Eigenschaften als Protein, dann ist leicht verständlich, daß die Xanthinoxidase-Aktivität in der Kuhmilch von milchtechnologischen Verfahren stark beeinflußt wird.

Ein Aktivitätsanstieg kann durch Zerstörung der Membran um die Fettkügelchen bedingt sein. Kühlung (Cerbulis und Farrell, 1977), Gefrieren (Auskristallisation der Triglyceride, Zikaris und Wooters, 1980) Lagerung (BHAVADASAN und GANGULI, 1980) oder mechanische Behandlung (Bhavadasan et al., 1982) der Milch, zum Beispiel Homogenisierung, erhöht die Xanthinoxidase-Aktivität in der Kuhmilch. Detergenzien wie Laurylsufat und Tween 60 (Robert und Polonovski, 1955) erhöhen ebenfalls ihre Aktivität in der Milch.

Erhitzung über 60 °C (Demott und Praepanitchai, 1978) führt zur Denaturierung des Enzyms.

1.1.3. Seltene Basen

Modifizierte oder seltene Basen sind in allen Nucleinsäurenformen gefunden worden. Meist handelt es sich um methylierte Derivate der Standardbasen. Die Modifizierung, deren Vielfalt der Abbildung 3 zu entnehmen ist, erfolgt erst nach der Transkription bei der sogenannten Reifung des Primärtranskripts zur funktionsfähigen Nucleinsäure.

Die Funktion der seltenen Basen ist nicht vollständig aufgeklärt. In der DNS wurde eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Methylierung und der Aktivität einiger Gene gefunden (Cohen, 1985). In der Transfer-RNS bewirken die methylierten Basen die Ausbildung der Kleeblattstruktur. Sie sind dort am häufigsten in den Armen der t-RNS zu finden. Durch ihre von den Standardbasen abweichende Raumstruktur verhindern sie die Ausbildung von Basenpaarungen und ermöglichen die Ausbildung der besonderen Tertiärstruktur dieser Nucleinsäurenspezies. Damit beeinflussen sie, über die Konformation der aktiven Zentren der t-RNS, Spezifität und Geschwindigkeit des Aminoacyltransfers, die Codon-Erkennung und die Bindung der t-RNS an das Ribosom (Schöch et al., 1976).

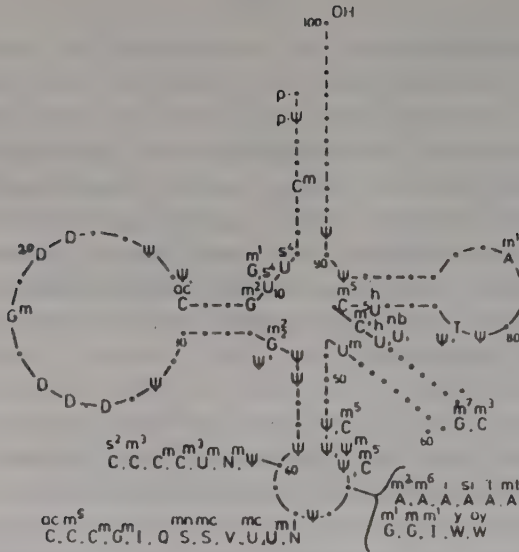


Abbildung 3: Allgemeine Struktur der Transfer-RNS

Die Kleeblatt-Schreibweise der Transfer-RNS zeigt den prinzipiellen Aufbau dieser Makromoleküle, die in den Zellen aller Lebewesen gleichermaßen vorhanden sind.

Die Punkte stellen einen der vier unmodifizierten Bausteine (Adenin, Uracil, Cytosin oder Guanin) dar; jeder Buchstabe symbolisiert eine der möglichen Modifikationen dieser vier Grundbausteine (aus Sodd, 1976).

Entscheidend für die Bedeutung der seltenen Basen in Grundlagenforschung und klinischer Anwendung ist, daß die beim Abbau der Nucleinsäuren anfallenden modifizierten Nucleoside und Basen weder über einen Salvage-Weg wiederverwendet, noch weiter abgebaut werden. Eine Abspaltung von Substituenten ist nur bei einem kleinen

Teil der seltenen Basen möglich. Ihre Konzentrationen im Urin spiegeln angenähert die Summe des RNS-Umsatzes in allen Organen wider. Die Ausscheidungsmenge jeder modifizierten Nucleobase pro 24 Stunden ist ein Normalwert, vergleichbar etwa mit der Kreatininausscheidung in 24 Stunden (Nass, 1986).

Für den Kliniker sind die seltenen Basen deshalb von besonderer Bedeutung, weil ihre Ausscheidung bei an Krebs erkrankten Personen erhöht ist. Eine erhöhte Ausscheidung über die Niere erlaubt Rückschlüsse auf das "cancerogene Potential von Chemikalien". Darüberhinaus kann "Krebs im Frühstadium diagnostiziert" (Nass, 1985), der "Erfolg einer Krebstherapie verfolgt" und "unterschiedliche Krebsformen durch spezifische Basenmuster im Urin unterschieden" (Schöch et al., 1979) werden.

Darauf, daß bei der Erstellung von Normalwerten für die Ausscheidung von modifizierten RNS-Kataboliten das Lebensalter und die Ernährung berücksichtigt werden müssen, machte Schöch aufmerksam (1983).

1.3. Problemstellung

Über Pyrimidin- und Purinverbindungen in der Milch ist bisher sehr wenig bekannt. Neben Harnsäure und Orotsäure wurden lediglich verschiedene Nucleotide nachgewiesen (Rashid, 1976), allerdings in Teilfraktionen und mit Methoden von begrenzter Spezifität. Ausführliche Untersuchungen liegen bisher nur über Orotsäure vor, die für die Milch von Wiederkäuern charakteristisch ist. Arbeiten an isolierten Mammozyten einerseits (Larson, 1976) und Infusion der $^{14}\text{-C}$ -markierten Vorstufe Aspartat in das Euter andererseits (Ahmed, 1978) zeigen, daß Orotsäure aus dem Milchdrüsengewebe stammt. In dem Gewebe selbst ist ihre einzige bisher bekannte Funktion ihre Verwendung als Vorstufe für die Pyrimidinsynthese. Offenbar übersteigt ihre Produktion diesen Bedarf bei weitem.

Zahlreiche in-vitro-Modelle können zur Klärung grundsätzlicher Fragestellungen verwendet werden (Kano-Sueoka, 1983): Bei isolierten, perfundierten Milchdrüsen bleibt die räumliche Anordnung der Milchdrüsenzellen unter sich und zu anderen Zelltypen unverändert. Eine Organoidkultur, bei der nach Kollagenaseverdauung fein zerschnittener Milchdrüsenstückchen die Stromazellen mit Hilfe von Differentialzentrifugation entfernt werden, setzt sich aus den eigentlichen Milchdrüsenzellen und aus Myoepithelzellen zusammen. Aufgrund der guten Versorgung jeder Zelle mit Substrat, der weitgehenden Erhaltung der räumlichen Anordnung der Zellen zueinander und der relativ hohen Überlebensrate eignet sie sich besonders für biochemische Untersuchungen.

Zellkulturen aus Milchdrüsenzellen, das heißt eine Primärkultur oder eine permanente Kultivierung von

einzelnen Zellen, sind für biochemische Untersuchungen nur bedingt geeignet, da normale isolierte Milchdrüsenzellen, im Gegensatz zu neoplastischen Zellen, in einer Zellkultur nicht sehr lange überleben und sie die für die Milchdrüse typischen Funktionen (wie die Lactose-synthese, Ebner et al., 1961) schnell verlieren.

Wenn man jedoch weitere Einflüsse, wie Rasse, Ernährung oder Milchleistung erfassen will, dann muß man Untersuchungen am lebenden Tier durchführen. Quantitative Daten aus in-vitro Messungen müssen am lebenden Tier verifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit war in einer ersten Stufe, Bedingungen für eine Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) zu entwickeln, die es erlaubten, alle Pyrimidin- und Purinverbindungen in der Milch in einem Arbeitsgang zu bestimmen. Mit der erarbeiteten Methode wurden die Pyrimidin- und Purinverbindungen in der Milch von Holstein-Friesian-Kühen nach Art und Menge gekennzeichnet und Einflüsse der Milchleistung auf ihre Menge festgestellt. Die Ergebnisse dieser ersten Stufe wurden schon früher veröffentlicht (Tiemeyer et al., 1984).

In einer zweiten Stufe sollten die Untersuchungen unter Erweiterung des Kollektivs mit Kühen der Rasse Deutsch-Fleckvieh und mit Holstein-Friesian-Kühen in späteren Laktationsabschnitten analytisch vertieft und in Hinblick auf die Auswertung der Daten maßgeblich erweitert werden, um mittels der Basen- und Nucleotidprofile Rückschlüsse auf Stoffwechselprozesse im Körper und in der Milchdrüse ziehen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

Um die angesprochenen Fragestellungen zu bearbeiten, wurden Milchproben von Holstein-Friesian-Kühen (HF) des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim sowie von Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) des Staatlichen Versuchsgutes Achselschwang gewonnen. Proben von HF-Kühen und DF-Kühen in einem vergleichbaren Laktationsstadium (42-70 Tage) und von HF-Kühen mit unterschiedlichem Laktationsstadium (83 - 378 Tage) wurden verglichen.

2.1. Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Zum Zeitpunkt der Probennahme hatten die Holstein-Friesian-Kühe eine durchschnittliche Jahresleistung von 6989 kg Milch. Die Herde bestand aus 104 Kühen, die in einem Laufstall mit Liegeboxen gehalten wurden. Die Kühe wurden von 4.00 Uhr bis 6.00 Uhr morgens und von 16.00 Uhr bis 18.00 Uhr abends gemolken.

Als Grundration erhielten die Tiere Maissilage und Heu ad libitum. Dabei war die für die gesamte Herde zugeteilte Menge so berechnet, daß für jede Kuh 23 kg Maissilage (33% Trockensubstanz je kg Trockenmasse (TS)), 3 kg Heu (86% TS), 2.5 kg Grüngras-Cops (90% TS) und 1 kg Kraftfutter (Sojaschrot, Hafer und Gerste im Verhältnis 1:1:1, 88% TS) zur Verfügung stand. Zusätzlich wurde je 2.3 kg Milch, die täglich über 15 kg hinaus erbracht wurden, 1kg Kraftfutter verfüttert.

Die Herde des Staatlichen Versuchsgutes Achselschwang hatte eine durchschnittliche Jahresleistung von 5596 kg Milch. Sie bestand im Untersuchungszeitraum aus 122 Deutsch-Fleckvieh-Kühen, die ebenfalls in einem Laufstall mit Liegeboxen gehalten wurden. Die Melkzeiten waren 4.30 Uhr bis 7.30 Uhr morgens und 16.30 Uhr bis 19.00 Uhr abends.

Das Grundfutter bestand aus Gras- und Maissilage und wurde ad libitum gegeben. Die für die gesamte Herde zugeteilte Menge war so berechnet, daß für jede Kuh 15.5 kg Grassilage (35% TS), 8.5 kg Maissilage (25% TS), 3 kg Trockenschnitzel (91% TS), 2.5 kg Grummet (86% TS) und 0.5 kg Stroh (86% TS) zur Verfügung standen. Zusätzlich wurden je 2.0 kg Milch, die täglich über 14.5 kg hinaus erbracht wurden, 1 kg Kraftfutter verfüttert.

Aus den oben beschriebenen Futterzusammensetzungen und Trockensubstanzgehalten wurde der Rohprotein- und Energiegehalt des Grundfutters nach den Angaben der DLG-Futterwerttabellen für Wiederkäuer (1982) ermittelt. Die errechneten Werte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Da das Grundfutter ad libitum verabreicht wurde, kann damit nicht die Versorgung jedes einzelnen Tieres genau angegeben werden. Der grundsätzliche Unterschied in der Fütterung der beiden Herden wird jedoch deutlich.

Subtrahiert man von dem Energiegehalt der Gesamtration den Erhaltungsbedarf für eine Milchkuh (durchschnittliches Gewicht: 650 kg; 37.7 MJ NEL /Tag, Kirchgessner, 1985) vom Energiegehalt der Gesamtration und dividiert die restliche Energie durch die jeweilige Milchleistung (kg/Tag), dann erhält man die in Abbildung 4 dargestellte Beziehung.

Tabelle 3: Futterwerte von Grundfutterrations (Durchschnittswert) und Kraftfutter der Versuchstiere

	Grundfutter *	Kraftfutter **
Holstein-Friesian-Kühe:		
NEL	84.5 MJ	6.9 MJ/kg
Rohprotein	1.58 kg	0.16 kg/kg
Fleckviehkühe:		
NEL	73.0 MJ	6.9 MJ/kg
Rohprotein	1.52 kg	0.18 kg/kg

* ad libitum

** 1kg je 2.3 kg über 15.0 kg Milch pro Tag (HF-Kühe)
 1kg je 2.0 kg über 14.5 kg Milch pro Tag (DF-Kühe)

Die Holstein-Friesian-Kühe erhielten demnach 3.12 MJ NEL je kg Milch. Sie wurden bedarfsgerecht gefüttert (Energiebedarf je kg Milch bei 4% Fettgehalt: 3.17 MJ NEL, Kirchessner, 1985).

Die Fleckviehkühe erhielten bei einer Milchleistung von 14.5 kg Milch pro Tag über das Grundfutter 2.36 MJ NEL je kg Milch. Damit waren sie unterversorgt (Energiebedarf je kg Milch bei 3.5% Fettgehalt: 2.97 MJ NEL, Kirchgessner, 1985). Dieses Energiedefizit wurde mit steigender Milchleistung und infolgedessen steigenden Kraftfutterzulagen geringer. Die DF-Kühe erhielten für 2.0 kg Milch (über 14.5 kg Milch pro Tag), die HF-Kühe für 2.3 kg Milch (über 15.0 kg Milch pro Tag) 1 kg Kraftfutter. Bei einer Milchleistung von 37 kg Milch pro Tag wurden auch die DF-Kühe bedarfsgerecht gefüttert.

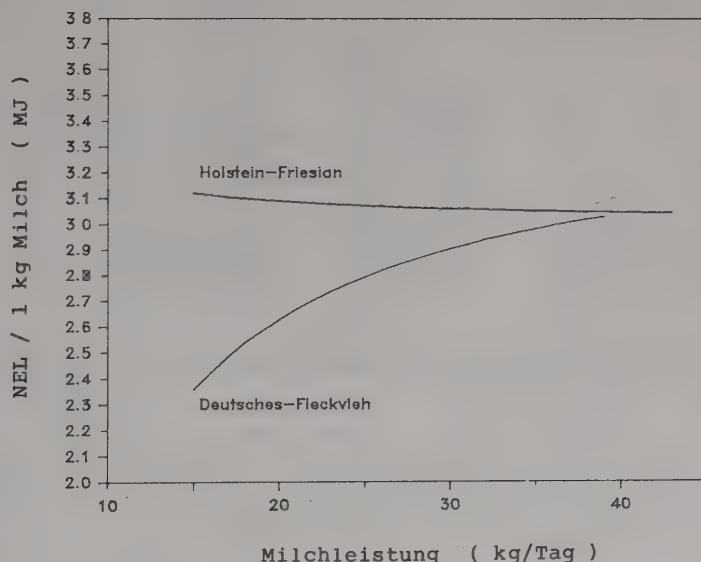


Abbildung 4: Energie (MJ) in Netto-Energie-Laktation (NEL), die nach Abzug des Erhaltungsbedarfes pro kg Milch den Holstein-Friesian-Kühen bzw. den Fleckvieh-Kühen zur Verfügung stand.

2.2. Milchleistung, Zahl der Laktationen, Laktationsstadium, Milchprotein und -fett der untersuchten Tiere

Die Mittelwerte und Standardabweichungen von Milchleistung, Milchprotein und -fett der untersuchten Tiere sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Milchleistung, Milchprotein- und -fett der untersuchten Tiere

	Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
vergleichbares Laktationsstadium:		
(42 - 70 Tage)		
Anzahl der Tiere	15	33
Milchleistung (kg/Tag)	29.03 $\pm$ 7.66	20.92 $\pm$ 5.58
Protein (g/100g Milch)	3.35 $\pm$ 0.23	3.35 $\pm$ 0.23
Fett (g/100g Milch)	3.85 $\pm$ 0.50	3.47 $\pm$ 0.50
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:		
(83 - 378 Tage)		
Anzahl der Tiere	11	
Milchleistung (kg/Tag)	15.62 $\pm$ 4.84	nicht
Protein (g/100g Milch)	3.78 $\pm$ 0.35	gemessen
Fett (g/100g Milch)	4.24 $\pm$ 0.57	

Die Abhängigkeit der Milchleistung der untersuchten Tiere von der Zahl der Laktationen wird in Abbildung 5 und in Tabelle 5 gezeigt.

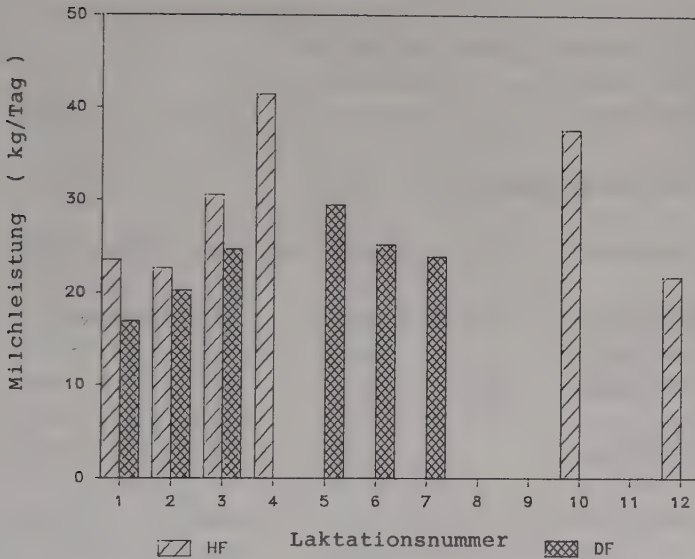


Abbildung 5: Mittelwerte der Milchleistung in Abhängigkeit von der Laktationsnummer der Holstein-Friesian-(HF) und Deutsch-Fleckvieh-Kühe (DF) mit vergleichbarem Laktationsstadium

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Milchleistung in Abhängigkeit von der Laktationsnummer

	Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
Milchleistung (kg/Tag)		
vergleichbares Laktationsstadium:		
1. Laktation	23.5 $\pm$ 3.5 (n=5)	16.9 $\pm$ 2.9 (n=11)
2. Laktation	22.7 (n=1)	20.3 $\pm$ 4.5 (n=11)
3. Laktation	30.6 $\pm$ 5.7 (n=5)	24.7 $\pm$ 3.7 (n=6)
4. Laktation	41.5 $\pm$ 1.8 (n=2)	keine Proben
5. Laktation	keine Proben	29.5 $\pm$ 13.4 (n=2)
6. Laktation	"	25.3 $\pm$ 1.8 (n=2)
7. Laktation	"	23.9 (n=1)
10. Laktation	37.6 (n=1)	keine Proben
12. Laktation	21.8 (n=1)	"
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:		
1. Laktation	14.5 $\pm$ 2.2 (n=6)	keine Proben
3. Laktation	18.9 $\pm$ 8.9 (n=3)	"
4. Laktation	15.8 (n=1)	"
6. Laktation	12.3 (n=1)	"

Die Veränderungen von Milchprotein und MilCHFett in Abhängigkeit von der Milchleistung sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen von Milchprotein (Prot%) und MilCHFett (Fett%) in Abhängigkeit von der Milchleistung (kg/Tag)

		Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
g/100g Milch			
vergleichbares Laktationsstadium:			
bis 20 kg/Tag	Prot%:	keine	3.40 $\pm$ 0.20
	Fett%:	Proben	3.65 $\pm$ 0.49 (n=14)
20 - 30 kg/Tag	Prot%:	3.15 $\pm$ 0.17	3.35 $\pm$ 0.23
	Fett%:	3.81 $\pm$ 0.61 (n=9)	3.39 $\pm$ 0.49 (n=17)
über 30 kg/Tag	Prot%:	2.98 $\pm$ 0.20	3.02 $\pm$ 0.29
	Fett%:	3.91 $\pm$ 0.32 (n=6)	2.97 $\pm$ 0.04 (n=2)
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:			
bis 20 kg/Tag	Prot%:	3.85 $\pm$ 0.29	keine
	Fett%:	4.33 $\pm$ 0.52 (n=10)	Proben
über 20 kg/Tag	Prot%:	3.11	keine
	Fett%:	3.40 (n=1)	Proben

2.3. Probengewinnung und -aufbereitung

Die Milchproben wurden jeweils abends und am darauffolgenden Morgen aus einem Aliquot des Sammelgemelkes entnommen. Dabei wurde die Milchleistung entweder durch Auffangen der gesamten Milchmenge des Gemelkes oder durch Absplitten eines repräsentativen Teiles des Gemelkes gemessen. Die Milchproben wurden sofort nach der Entnahme bei 1 100 * g für 30 Minuten zentrifugiert, um die in der Milch enthaltenen Zellen zu entfernen. Der zellfreie Überstand wurde sogleich eiskühlt, binnen einer Stunde in das Labor transportiert, dort bei -20°C eingefroren und bis zur Analyse gelagert.

Vor der Analyse wurden die Milchproben bei 37°C aufgetaut und anteilmäßig nach der Milchmenge des Abend- und Morgengemelkes gemischt.

Um ein schnelles Kontaminieren der HPLC-Säule zu vermeiden, wurden die Proteine und Lipide der Milch vor der Analyse entfernt. Hierfür wurde den Milchproben Natriumlaurylsulfat bis zu einer Endkonzentration von 0.1% (g/100ml) zugesetzt, 15 Minuten gerührt, danach 15 Minuten mit dem gleichen Volumen Chloroform kräftig geschüttelt (Schüttelgerät Fa. Heidolph, Kehlheim) und anschließend 30 Minuten bei 33 000 * g zentrifugiert (Tiemeyer et al., 1984). Der klare wässrige Überstand wurde für die HPLC-Analyse verwendet.

2.4. Analytische Methoden

Die Pyrimidin- und Purinverbindungen wurden mit Hilfe der Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie identifiziert und quantifiziert. Das HPLC-System bestand aus zwei Pumpen (Modell 6000 A, Fa. Waters Associates, Königstein/Ts) und (BIP-1, Fa. Jasco, Tokyo, Japan), einem Universal-Einspritzsystem (Modell U6K, Fa. Waters), einem Einspritzsystem mit fester Schleife (Modell 7125, Rheodyne Inc., USA), einem UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (Modell 450, Fa. Waters), einem UV-Detektor mit auswechselbaren Filtern (Modell 440, Fa. Waters). Zur Aufzeichnung der Peaks und Integration der Peakflächen stand ein Integrator (Modell 3380 A, Fa. Hewlett Packard, Frankfurt) zur Verfügung.

Sämtliche Elutionsmittel wurden vor der Verwendung durch ein Membranfilter (Typ HA, Porengröße 0.45 μm , Fa. Millipore Corp., Bedford, USA) filtriert.

Für die Entwicklung der analytischen Methode und für die Bestimmung der Pyrimidine und Purine in der Milch der Holstein-Friesian-Kühe wurden zwei hintereinander gekoppelte μ -Bondapak-Säulen der Fa. Waters verwendet. Sie hatten einen Durchmesser von 4 mm und zusammen eine Länge von 600 mm. Die Trennleistung dieser zusammengesetzten Säule betrug ca. 9 500 Böden.

Die Analyse der Milchproben von den Deutsch-Fleckvieh-Kühen und die Bestimmung der seltenen Basen wurde mit Hilfe eines anderen Umkehrphasen-Säulenmaterials durchgeführt. Die dazu verwendete Säule war aus zwei

Einzelsäulen (je: 4.6 mm * 250 mm, Fa. Grom, Ammerbuch) zusammengesetzt. Das Füllmaterial war Spherisorb ODS-II, 5 μ m. Die Trennleistung dieser Doppelsäule betrug 26 700 Böden.

2.4.1 Entwicklung der analytischen Methode

Mit den bisher bekannten Methoden zur Bestimmung von Pyrimidin- und Purinverbindungen in der Milch konnten nur einzelne Verbindungen in unspezifischen Reaktionen (Orotsäure, Allantoin) bzw. die säurelöslichen Nucleotide gemessen werden. Die von Tiemeyer und Giesecke (1982) beschriebenen analytischen Bedingungen mußten so weiterentwickelt werden, daß alle Pyrimidin- und Purinverbindungen in der Milch möglichst in einem Arbeitsgang bestimmt werden konnten.

Das chromatographische Verhalten einer Verbindung hängt von ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften ab. Dabei sind für die Detektion der Pyrimidine und Purine ihre Absorptionsmaxima im UV-Licht und für ihre Auftrennung an Umkehrphasensäulen ihre Eigenschaften als schwache Säuren und als schwache Basen von Bedeutung.

Bedingt durch die konjugierten Doppelbindungen des Pyrimidinringes bzw. Purinringes absorbieren alle Pyrimidinderivate und Purinderivate im UV-Licht mit Absorptionsmaxima zwischen 255 und 283 nm. Im Gegensatz dazu absorbiert das Allantoin, bei dem der Purinring aufgespalten ist, das UV-Licht unter 200 nm maximal. Mit ansteigender Wellenlänge nimmt die Absorption exponentiell ab. Bei 240 nm beträgt die Absorption des Lichtes

noch etwa 4% der Absorption bei 200 nm. Aufgrund des von den Pyrimidin- und Purinderivaten so stark abweichenden Absorptionsmaximums muß Allantoin getrennt analysiert werden.

Die Retentionszeit einer Verbindung hängt bei der Verwendung von Umkehrphasensäulen maßgeblich von ihrer Polarität ab. Unpolare, ungeladene Verbindungen werden länger an der stationären Phase zurückgehalten und erscheinen später im Eluat. Polare, geladene Moleküle verteilen sich mehr in der mobilen Phase und erscheinen früher im Chromatogramm. Diese Eigenschaften werden genutzt, um Trennungen zu erreichen. Dabei läßt sich die Polarität der Basen über den pH-Wert des Elutionsmittels beeinflussen. Dazu steht dem Analytiker der Bereich zwischen pH 2 und pH 8 zur Verfügung. Dies ist bedingt durch die Stabilität der Bindungen zwischen den Hydroxygruppen des Kieselgels, das in Form von 10 μm großen, gebrochenen Teilchen die Grundlage der u-Bondapak Säule ausmacht bzw. in Form von 5 μm großen, runden Teilchen das Trägermaterial der verwendeten ODS-Säulen darstellt, und den C18-Körnern, die die Säule zur Umkehrphasensäule (im Gegensatz zu früheren Säulen mit polarer Oberfläche) mit unpolarer Oberfläche machen.

Da die meisten Pyrimidine und Purine saure bzw. basische Gruppen mit pK-Werten in diesem pH-Bereich haben, kann ihre Ladung und folglich ihr chromatographisches Verhalten, bedingt durch die Veränderung ihrer Polarität, beeinflußt werden. Die Polarität des Elutionsmittels läßt sich durch Steigerung seiner Ionenstärke erhöhen. Generell längere Retentionszeiten sind die Folge. Will man die Retentionszeiten verkürzen, dann können unpolarere Komponenten, wie zum Beispiel Methanol zugesetzt werden.

2.4.2. Bestimmung der Pyrimidine und Purine in der Milch

In einer ersten Stufe wurde eine enteiweißte und entfettete Milchprobe aufgegeben (Elutionsmittel: 0.001 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 5.0, μ -Bondapak Säule) und die aufgetrennten Verbindungen bei 254 nm aufgezeichnet. Danach wurden pH-Wert und Ionenstärke des Elutionsmittels systematisch verändert. Es wurden Elutionsmittel mit pH-Werten zwischen pH 2 und pH 8 in Stufen von je einer pH-Einheit durchgetestet. Die Ionenstärke wurde von 0.0001 mol/l (über 0.005 mol/l, 0.01 mol/l und 0.05 mol/l) bis 0.1 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ variiert. Die optimale Auftrennung aller Peaks wurde bei 0.01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ und pH 6.0 erzielt (vergleiche Abbildung 6).

Zur Identifizierung der Peaks wurden unter denselben chromatographischen Bedingungen sämtliche bekannten Pyrimidin- und Purinverbindungen (Basen, Nucleoside und Nucleotide, außer den seltenen Basen) aufgegeben und ihre Retentionszeiten mit den Retentionszeiten der im Chromatogramm der Milchprobe erhaltenen Peaks verglichen. Bei vergleichbaren Retentionszeiten wurden kleine Mengen der Standardlösungen mit der Milchprobe eingespritzt. Wurde der interessierende Peak größer, dann verstärkte sich die Gewissheit der Identifizierung. Entstand ein zusätzlicher Peak an einer ohne Zugabe freien Stelle, dann war die interessierende Verbindung als in nicht meßbaren Konzentrationen in der Milch erkannt.

Die Sicherheit der Identifizierung wurde anschließend auf vier mögliche Weisen erhöht. Zum einen wurden die chromatographischen Bedingungen variiert und die oben angeführte Überprüfung der Identifizierung wiederholt.

Zweitens wurde das Verhältnis der Absorption bei 280 nm zur Absorption bei 254 nm von Standardlösungen und zu identifizierenden Peaks verglichen. Auf diese Weise konnte auch die Reinheit eines Peaks getestet werden.

Drittens wurden Enzymreaktionen durchgeführt. Dazu wurden 50 µl enteiweißte und entfettete Milch mit 10 µl des entsprechenden Enzyms (Guanase EC 3.5.4.3, Xanthin-Oxidase EC 1.2.3.2 und Uricase EC 1.7.3.3, alle Fa.Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach mittels HPLC analysiert.

Für eine immer noch nicht identifizierte Substanz (Hippursäure) wurde das Eluat aufgefangen und nach Konzentrierung im Rotationsverdampfer das UV-Spektrum gemessen. Anschließend wurde das erhaltene Spektrum mit bekannten Spektren verglichen.

Die Quantifizierung erfolgte über den Peakflächenvergleich zwischen Probe und Standardlösungen (alle Standards als Festsubstanzen von Sigma, St. Louis, USA), die an jedem Analysentag frisch mit entionisiertem, destilliertem und danach millipore-filtrierte Wasser angesetzt wurden.

Bei den Proben, die mit den µ-Bondapak-Säulen (Abbildung 6 und 7) gemessen wurden (Milchproben von den Holstein-Friesian-Kühen), wurde die Orotsäure über den Integrator ausgewertet. Alle übrigen Peaks und Allantoin, wurden, da für kleine Peaks die Integratorauswertung zu ungenau war, von Hand nach der Dreiecksmethode (Schwendt, 1979) ausgemessen und berechnet. Bei den an den Spherisorb-ODS-II-Säulen bestimmten Proben (Milchproben von

Deutsch-Fleckvieh-Kühen, Abbildung 8 und 9) wurden neben Orotsäure auch Harnsäure, Kreatinin und Uridin über den Integrator ausgewertet.

Die analytischen Bedingungen sind im Einzelnen mit den Chromatogrammen den Abbildungen 6 bis 9 zu entnehmen.

Zur Bestimmung der seltenen Basen wurden die bei den Milchproben der DF-Kühe verwendeten Bedingungen modifiziert. Dabei wurden pH-Wert und Ionenstärke des Elutionsmittels verändert und diesem bis zu 20% Methanol zugesetzt. Diese Proben wurden nach 10-facher Konzentrierung bestimmt.

Abbildung 6: Chromatogramm der enteweißten und entfetteten Milch einer HF-Kuh

I
Säule: μ -Bondapak C18 (4mm*600mm)
Elutionsmittel: 0.01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0)
Detektion bei 254 nm Flußrate: 1.0 ml/min
Einspritzvolumen: 10 μ l

- I: Orotsäure
- II: Harnsäure
- III: Kreatinin
- IV: Pseudouridin
- V: Cytidin
- VI: Hypoxanthin
- VIII: Uridin
- IX: Hippursäure

35

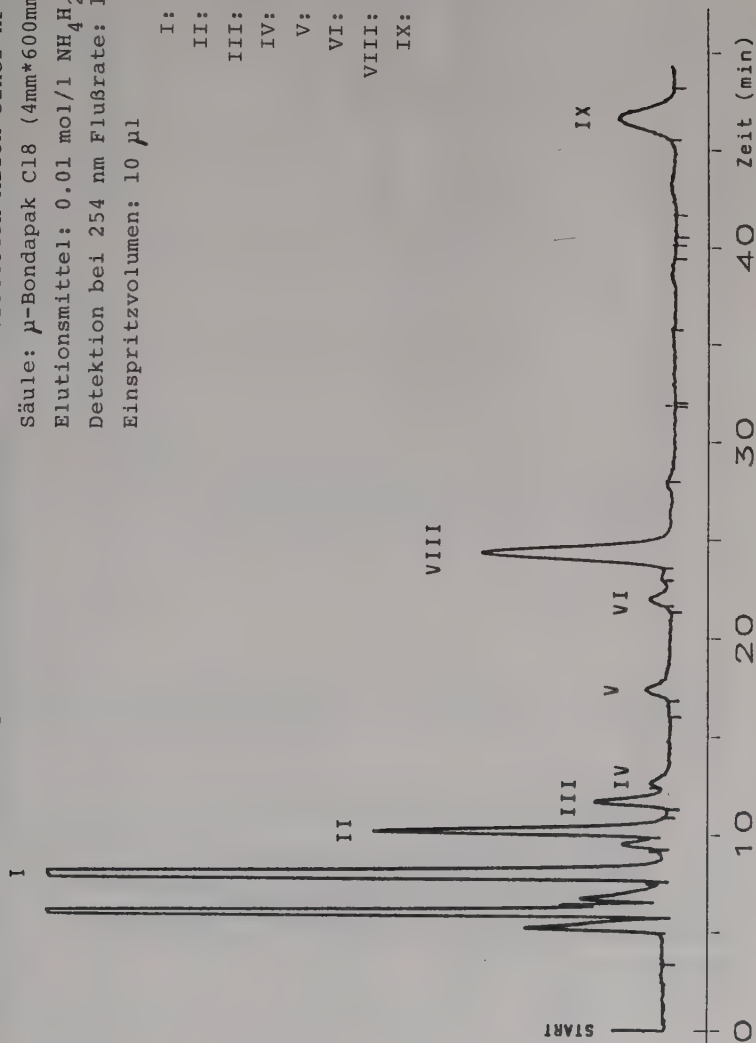




Abbildung 7: Chromatogramm der enteiweißten und entfetteten Milch einer Holstein-Friesian-Kuh

A = Allantoin

Säule: μ -Bondapak C18 (4mm*600mm)

Elutionsmittel: 0.01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0)

Detektion bei 218 nm, Flußrate 1.0 ml/min

Einspritzvolumen: 5 μ l

Abbildung 8: Chromatogramm der enteiweißten und entfetteten Milch einer DF-Kuh

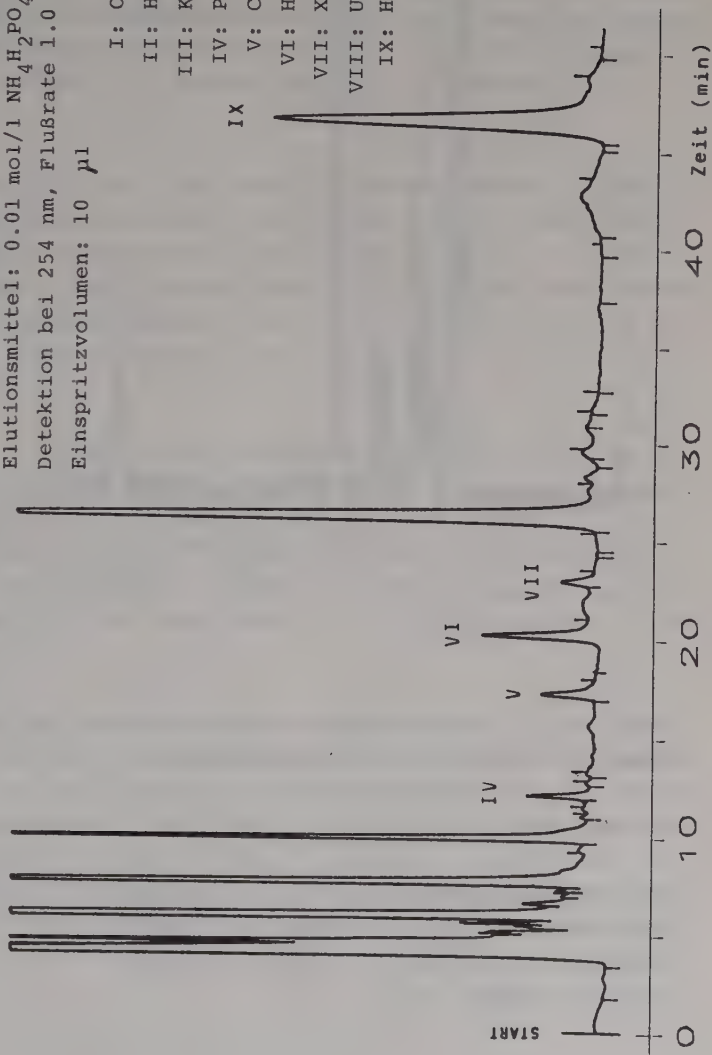
I II III

VIII Säule: Spherisorb ODS II: 5 μm (4.6mm*500mm)Elutionsmittel: 0.01 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0)

Detektion bei 254 nm, Flußrate 1.0 ml/min

Einspritzvolumen: 10 μl

- I: Orotsäure
 II: Harnsäure
 III: Kreatinin
 IV: Pseudouridin
 V: Cytidin
 VI: Hypoxanthin
 VII: Xanthin
 VIII: Uridin
 IX: Hippursäure



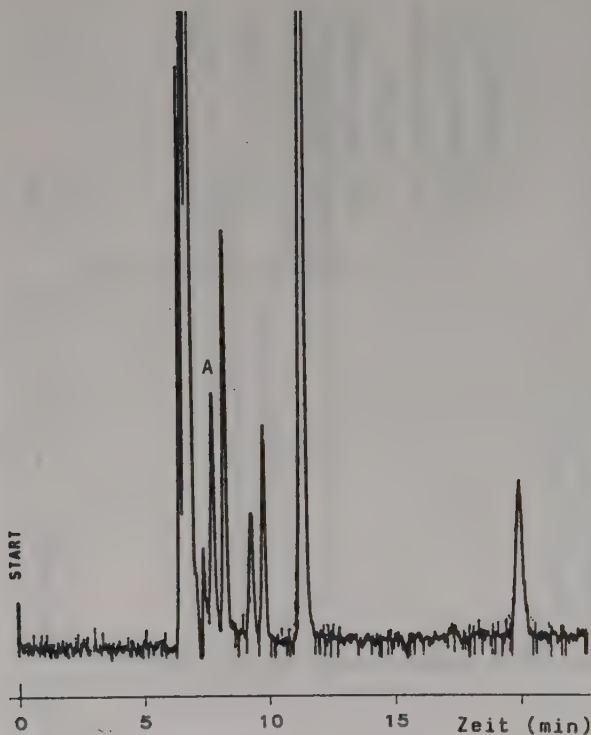


Abbildung 9: Chromatogramm der enteiweißten und entfetteten Milch einer Deutsch-Fleckvieh-Kuh

A = Allantoin

Säule: Spherisorb ODS II 5 μm (4.6mm*500mm)

Elutionsmittel: 0.5 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 5.0)

Detektion bei 214 nm, Flußrate 0.7 ml/min

Einspritzvolumen: 5 μl

2.4.3. Prüfung der methodischen Bedingungen

An jedem Analysentag wurde die HPLC-Anlage mit einer Orotsäurestandardlösung überprüft. Nur wenn der Variationkoeffizient von mindestens 5 identischen Proben 1% oder kleiner war, wurden Analysen durchgeführt.

Zur Prüfung der Linearität der Methode wurden jeweils 10 μ l von 8 Standardlösungen jeder gemessenen Verbindung im Konzentrationsbereich von 1 μ mol/l bis zu 1 mmol/l gemessen. Die Korrelationskoeffizienten der berechneten Regressionsgeraden zwischen der Konzentration und der Peakfläche lagen über 0.999.

Die Richtigkeit der Bestimmungen wurde mit Hilfe der Wiederfindung (vgl. Tabelle 7) eines bekannten Standardzusatzes zu nativer Milch und die Präzision durch Mehrfachbestimmung derselben Probe beurteilt. Die Präzision ist als Prozent der Standardabweichung der Stichprobe vom Mittelwert (Variationskoeffizient VK) angegeben.

Die fehlende Wiederfindung von Hypoxanthin und Xanthin ist auf die Xanthinoxidase-Aktivität in der Milch zurückzuführen. Bei ähnlichen analytischen Bedingungen wurde in säurefixiertem Blutplasma Hypoxanthin und Xanthin vollständig wiedergefunden (Schreiber, 1984).

Tabelle 7: Präzision und Richtigkeit der Pyrimidin- und Purinbestimmung in der Milch von Holstein-Friesian- (HF) und Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF); (-: nicht bestimmt) :

	zugesetzte Menge ($\mu\text{mol/l}$)	n	Wieder- findung in %	Präzision HF DF in %	
Allantoin	205.0	12	100.5	5.2	2.6
Orotsäure	302.3	10	99.6	1.6	0.7
Harnsäure	199.3	10	99.5	2.3	1.3
Kreatinin	103.4	10	100.5	-	1.8
Pseudouridin	3.8	8	99.3	-	2.1
Cytidin	5.8	10	99.2	1.5	1.2
Hypoxanthin	7.1	10	-	3.4	1.3
Xanthin	3.2	10	-	-	3.2
Uridin	73.1	10	99.7	2.5	1.1
Hippursäure	104.7	9	97.6	3.9	3.5
Cytidin- 5'-Monophosphat	2.9	10	-	3.1	-
Guanosin- 5'-Monophosphat	1.8	10	-	2.3	-

2.5. Auswertung

2.5.1. Berechnung der Konzentrationen in der Milch und der Ausscheidungsmengen über die Milch

Die in der wässrigen Phase der Milch gemessenen Konzentrationen wurden für jede einzelne Probe, unter Berücksichtigung des Protein- und Fettgehaltes, nach der folgenden Gleichung auf unbehandelte Milch korrigiert:

$$K_u = K_w * (96.99 \text{ ml} - V_p - V_f) ./ 96.99 \text{ ml}$$

K_u (mol/l): berechnete Konzentration in der unbehandelten Milch

K_w (mol/l): gemessene Konzentration in der wässrigen Phase der Milch

96.99 ml : Volumen von 100g Milch (Dichte von Vollmilch : 1.031 g/ml)

V_p (ml): Volumen des Milchproteins in 100g Milch = Proteingehalt der Milch (g/100g Milch) multipliziert mit dem partiellen spezifischen Volumen des Milchproteins: 0.732 ml/g

V_f (ml): Volumen des Milchfettes in 100g Milch = Fettgehalt der Milch (g/100g Milch) multipliziert mit dem partiellen spezifischen Volumen des Milchfettes : 1.076 ml/g

Bei der Berechnung von Ausscheidungsmengen über die Milch wurde die Konzentration mit der Milchleistung in Liter (Milchmenge (kg) / Dichte von Milch) multipliziert.

2.5.2. Statistische Methoden

Sämtliche Berechnungen erfolgten nach den von Sachs (1984) angegebenen Methoden. Dazu wurden die entsprechenden mathematischen Formeln mit Hilfe eines IBM-Personal-Computers in ein Tabellenkalkulationsprogramm übernommen, an welchem dann alle Berechnungen ausgeführt wurden.

Ergebnisse werden als Einzelwerte oder Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Konzentrations- und Mengenunterschiede von vergleichbaren Stichproben wurden mit Hilfe des T-Testes oder des U-Testes (bei kleinem Stichprobenumfang) auf Signifikanz geprüft. Varianzen wurden mit Hilfe des F-Testes auf Signifikanz der Unterschiede geprüft. Die nach der Berechnung von linearen Regressionen erhaltenen Korrelationskoeffizienten wurden mit Hilfe einer Signifikanz-Tabelle für r (Documenta Geigy, 1968) auf Signifikanz gegen Null geprüft. Hyperbeln wurden nach linearisierender Transformation (x -Werte als Kehrwert) als lineare Regressionen berechnet. Geraden wurden bezüglich ihres y -Achsenabschnittes und ihrer Steigung auf Signifikanz der Unterschiede geprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Pyrimidinverbindungen

3.1.1 Orotsäure

Die Konzentration der Orotsäure in der Milch von Holstein-Friesian-Kühen in vergleichbarem Laktationsstadium (42 - 70 Tage) betrug $554 \pm 149 \mu\text{mol/l}$.

Im Vergleich dazu enthielt die Milch der DF-Kühe mit $447 \pm 105 \mu\text{mol/l}$ signifikant ($p < 0.01$) weniger Orotsäure. Die Konzentration der Orotsäure in der Milch der Holstein-Friesian-Kühe mit späterem, unterschiedlichem Laktationsstadium (83 - 378 Tage) betrug $671 \pm 189 \mu\text{mol/l}$. Ein Unterschied gegenüber den Holstein-Friesian-Kühen mit vergleichbarem Laktationsstadium ließ sich statistisch nicht absichern (vgl. Tabelle 8).

Mit zunehmender Milchleistung nimmt die Konzentration der Orotsäure in der Milch der HF-Kühe im vergleichbaren Laktationsstadium (vergl. Abbildung 10) ab. Der Zusammenhang läßt sich mit Hilfe einer linearen Beziehung beschreiben. Bei einem Anstieg der Milchleistung von 20 kg/Tag auf 40 kg/Tag sinkt die Orotsäurekonzentration in der Milch von $702 \mu\text{mol/l}$ um 43% auf $398 \mu\text{mol/l}$.

Bei den DF-Kühen ergab sich hier keine gesicherte Beziehung. Im späteren unterschiedlichen Laktationsstadium war auch bei den HF-Kühen keine Abhängigkeit vorhanden.

Tabelle 8: Orotsäurekonzentration in der Milch von
Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühen

	Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
	$\mu\text{mol/l}$	
vergleichbares Laktationsstadium: (42 - 70 Tage)	554 $\pm$ 149 (n = 15)	*447 $\pm$ 105 (n = 33)
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium: (83 - 378 Tage)	671 $\pm$ 189 (n = 11)	keine Proben

* signifikant ($p < 0.01$) verschieden

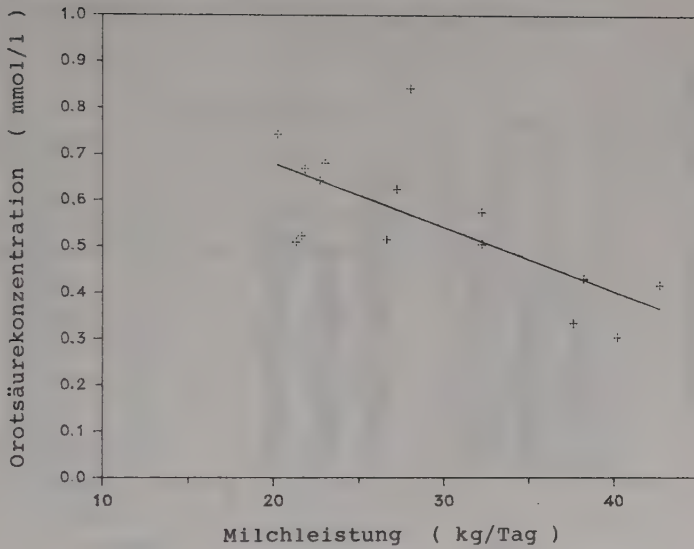


Abbildung 10: Orotsäurekonzentration (y , mmol/l) in der Milch von Holstein-Friesian-Kühen mit vergleichbarem Laktationsstadium in Abhängigkeit von der Milchleistung (x , kg Milch/Tag)

$$y = 0.955 - 0.014 x$$

$$r = -0.708$$

$$n = 15$$

$$p < 0.01$$

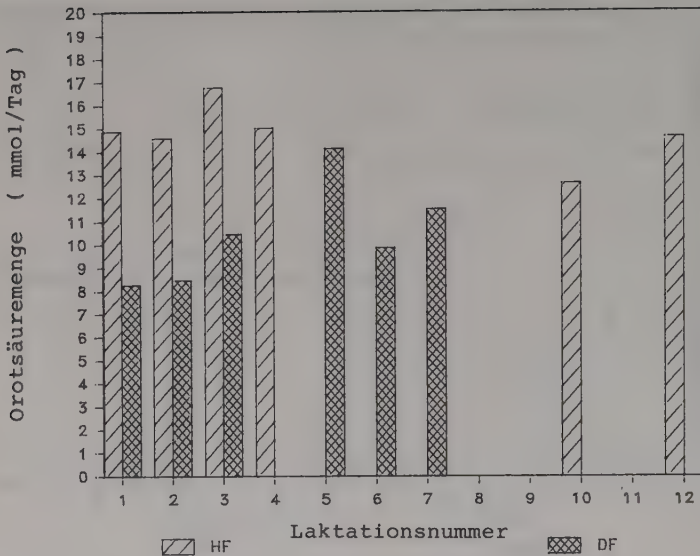


Abbildung 11: Tägliche Orotsäureausscheidung über die Milch von Holstein-Friesian- (HF) und Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) mit vergleichbarem Laktationsstadium in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen

Die tägliche Orotsäureausscheidung über die Milch zeigen Abbildung 11 und in Tabelle 9. Bei der vergleichenden Betrachtung mit Abbildung 5 (Milchleistung in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen) fällt insbesondere bei den Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) die Ähnlichkeit des Verlaufes auf. Von der ersten bis zur fünften Laktation wird mit zunehmender Laktationsnummer mehr Milch sekretiert und werden zunehmende Mengen Orotsäure über die Milch abgegeben. Mit weiter steigender Laktationsnummer wird weniger Milch und weniger Orotsäure sekretiert.

Tabelle 9: Tägliche Orotsäureausscheidung über die Milch in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen

	Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
Orotsäureausscheidung (mmol/Tag) vergleichbares Laktationsstadium:		
1. Laktation	14.4 $\pm$ 5.0 (n=5)	8.0 $\pm$ 2.3 (n=11)
2. Laktation	14.2 (n=1)	8.2 $\pm$ 2.3 (n=11)
3. Laktation	16.3 $\pm$ 1.0 (n=5)	10.1 $\pm$ 3.3 (n=6)
4. Laktation	14.6 $\pm$ 3.8 (n=2)	keine Proben
5. Laktation	keine Proben	13.7 $\pm$ 9.4 (n=2)
6. Laktation	"	9.6 $\pm$ 2.0 (n=2)
7. Laktation	"	11.2 (n=1)
10. Laktation	12.2 (n=1)	keine Proben
12. Laktation	14.1 (n=1)	"
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:		
1. Laktation	10.7 $\pm$ 3.8 (n=6)	keine Proben
3. Laktation	10.4 $\pm$ 3.4 (n=3)	"
4. Laktation	11.0 (n=1)	"
6. Laktation	4.4 (n=1)	"

Die tägliche Orotsäureabgabe über die Milch in Abhängigkeit von der Milchleistung ist in Tabelle 10 und Abbildung 12 bis Abbildung 15 dargestellt. Bedingt durch das noch kleinere Euter unterschieden sich dabei signifikant primipare Holstein-Friesian-Kühe, die am meisten Orotsäure ausschieden, von multiparen Holstein-Friesian-Kühen. Bei den Deutsch-Fleckvieh-Kühen, welche die geringste Orotsäureausscheidung aufwiesen, wurde kein Unterschied zwischen primiparen und multiparen Tieren deutlich.

Der Verlauf der Orotsäureausscheidung in Abhängigkeit von der Milchleistung ist bei allen untersuchten Gruppen gleich. Mit zunehmender Milchleistung bis zu 20kg Milch pro Tag stieg die Orotsäureausscheidung steil an. Dieser Anstieg flachte sich bei Milchleistungen zwischen 20kg und 30kg pro Tag ab. Bei Milchleistungen von über 30kg pro Tag blieb die Orotsäureausscheidung konstant auf einem hohen Plateau. Dies wird vor allem bei den multiparen Holstein-Friesian-Kühen deutlich (vergleiche Abbildung 13).

Mathematisch läßt sich die Orotsäureausscheidung (y) in Abhängigkeit von der Milchleistung (x) mit Hilfe einer Hyperbel beschreiben:

$$y = a + b / x$$

Dabei unterschieden sich nur die y-Achsenabschnitte (a) zwischen Deutsch-Fleckvieh-Kühen und primiparen Holstein-Friesian-Kühen statistisch signifikant ($p < 0.05$). Die Steigungen (b) waren jedoch zwischen allen Gruppen unterschiedlich (jeweils $p < 0.0001$).

Tabelle 10: Tägliche Orotsäureabgabe über die Milch in Abhängigkeit von der Milchleistung

Holstein-Friesian · · Deutsch-Fleckvieh			
Orotsäureausscheidung (mmol/Tag)			
primipare Tiere			
Milchleistung			
bis 20 kg/Tag	10.7 $\pm$ 3.8 (n=6)	8.1 $\pm$ 2.5 (n=10)	
über 20kg/Tag	14.4 $\pm$ 5.0 (n=5)	7.8 (n=1)	
multipare Tiere			
Milchleistung			
bis 20 kg/Tag	8.2 $\pm$ 3.0 a (n=4)	6.8 $\pm$ 0.8 b (n=6)	
über 20 kg/Tag	15.0 $\pm$ 1.9 c (n=11)	10.5 $\pm$ 3.6 d (n=16)	

b : a nicht signifikant unterschiedlich
 d : c signifikant niedriger ($p < 0.001$)
 a : c signifikant niedriger ($p < 0.001$)
 b : d signifikant niedriger ($p < 0.05$)

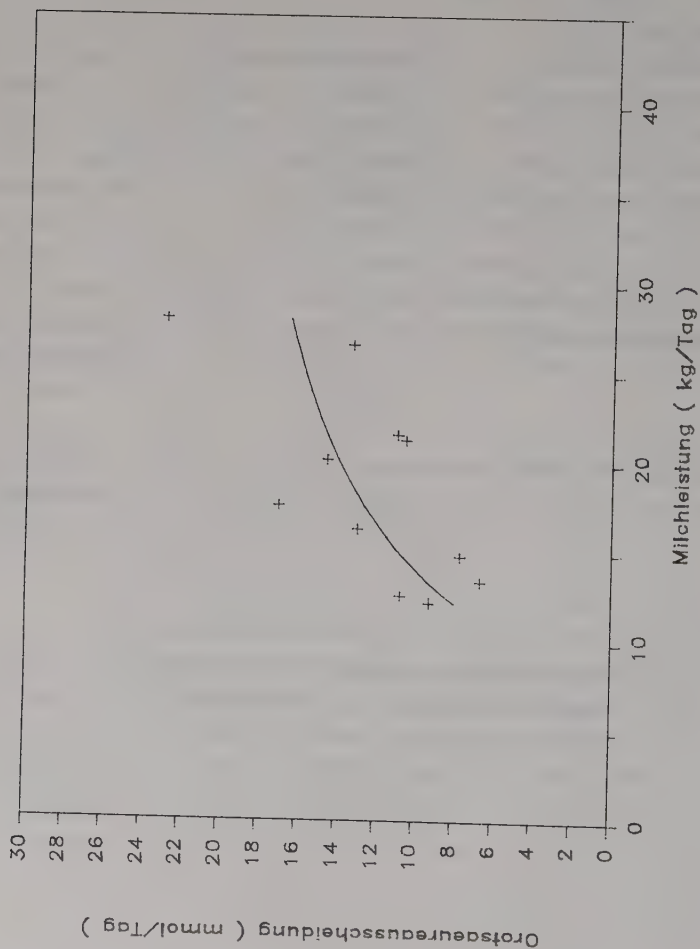


Abbildung 12:

Orotsäureausscheidung
(y, mmol/Tag) in der
Milch von primiparen
Holstein-Friesian-Kühen
(+) in Abhängigkeit von
der Milchleistung (x,
kg/Tag):

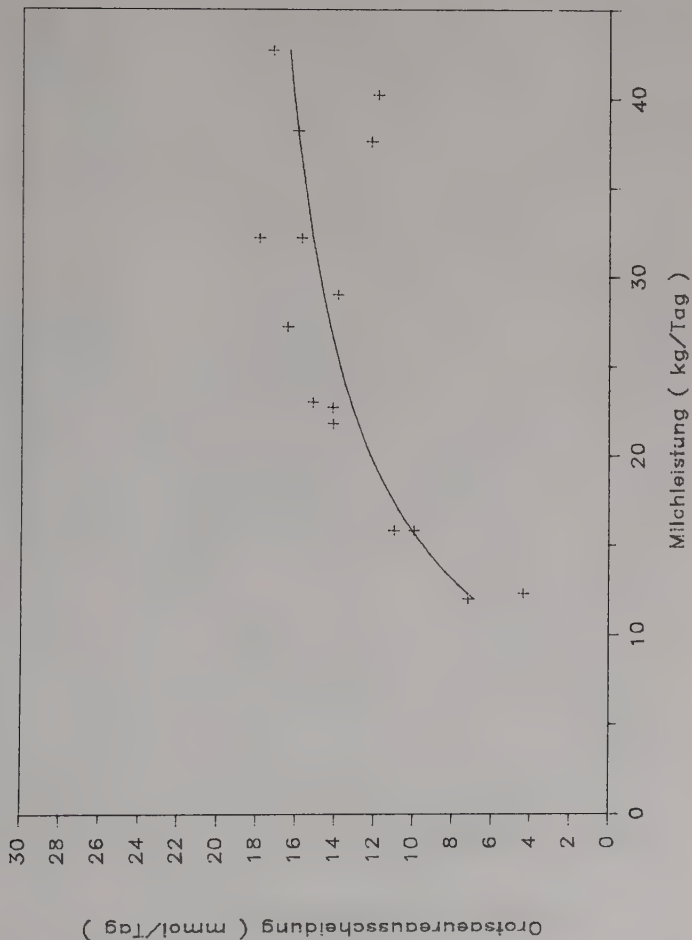
$$y = 23.031 - 183.075 / x$$

$$n = 11$$

nach linearer Trans-
formation:

$$r = -0.652$$

$$p < 0.05$$



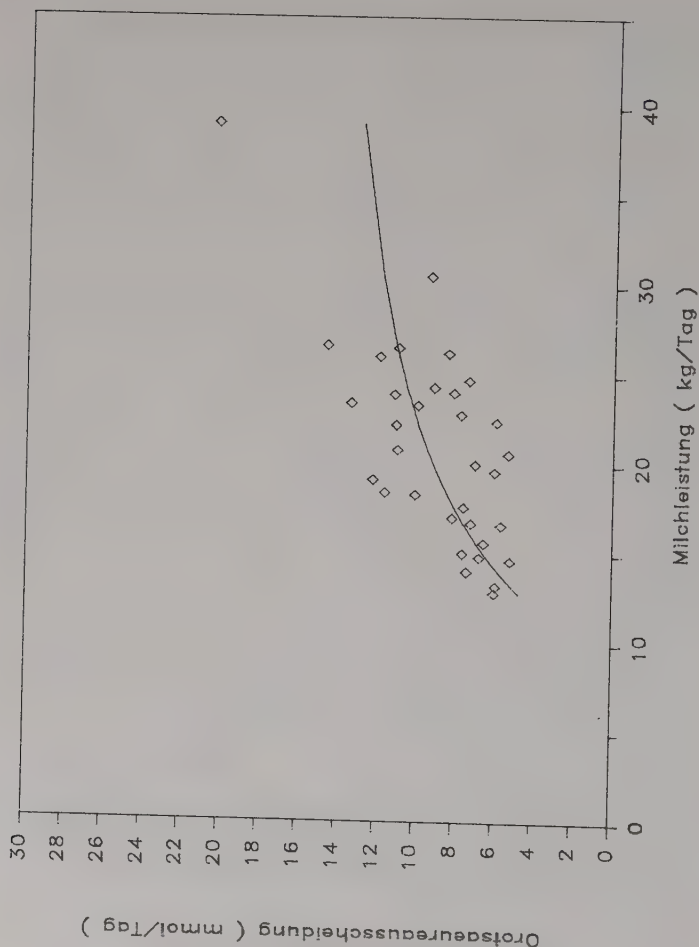


Abbildung 14:

Orotsäureausscheidung
(y , mmol/Tag) in der
Milch von Deutsch-
Fleckvieh-Kühen (ϕ) in
Abhängigkeit von der
Milchleistung (x ,
kg/Tag):

$$y = 16.991 - 156.625 / x$$

$n = 33$

nach linearer Trans-
formation:

$r = -0.630$

$p < 0.001$

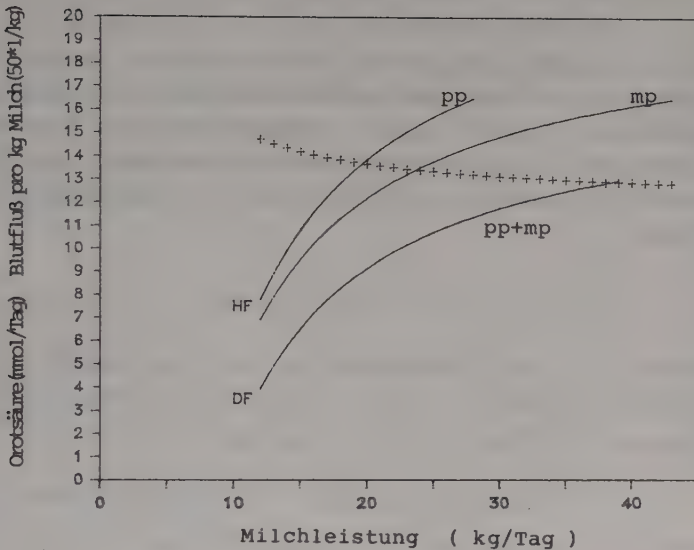


Abbildung 15: Orotsäureausscheidung in der Milch (y, mmol/Tag) von primiparen Holstein-Friesian-Kühen (HFpp), multiparen Holstein-Friesian-Kühen (HFmp) und von Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) in Abhängigkeit von der Milchleistung (x, kg/Tag). Berechneter Blutfluß (BF, vgl. Diskussion 4.1., +) durch die Milchdrüse (y, 50*1/Tag*kg Milch) in Abhängigkeit von der Milchleistung.

HFpp: $y = 23.031^a - 183.075^c / x$	signifikant unter-
	scheiden sich:
HFmp: $y = 20.134^d - 158.580 / x$	b:a ($p < 0.05$)
	d:c ($p < 0.0001$)
DF : $y = 16.991^b - 156.625^e / x$	e:c ($p < 0.0001$)
	e:d ($p < 0.0001$)
BF : $y = 605 + 1570 / x$	

3.1.2 Uridin

Die Uridinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian-Kühen mit vergleichbarem Laktationsstadium betrug $29.6 \pm 24.4 \mu\text{mol/l}$ (vgl. Tabelle 11). Damit unterschied sie sich nicht signifikant von der Milch der Deutsch-Fleckvieh-Kühe, welche $37.8 \pm 13.9 \mu\text{mol/l}$ Uridin enthielt.

Tabelle 11: Uridinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühen

	Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
	$\mu\text{mol/l}$	
vergleichbares Laktationsstadium: (42 - 70 Tage)	29.6 ± 24.4 (n = 15)	37.8 ± 13.9 (n = 33)
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium: (83 - 378 Tage)	$*13.5 \pm 4.8$ (n = 11)	keine Proben

* signifikant ($p < 0.05$) verschieden

Bei den Deutsch-Fleckviehkühen sank mit zunehmender Milchleistung die Konzentration des Uridins in der Milch (vgl. Abbildung 16). Die Uridinkonzentration in der Milch der Holstein-Friesian-Kühe mit späterem, unterschiedlichem Laktationsstadium betrug $13.5 \pm 4.8 \mu\text{mol/l}$. Der Unterschied gegenüber den Holstein-Friesian-Kühen mit vergleichbarem Laktationsstadium ließ sich statistisch mit $p < 0.05$ absichern.

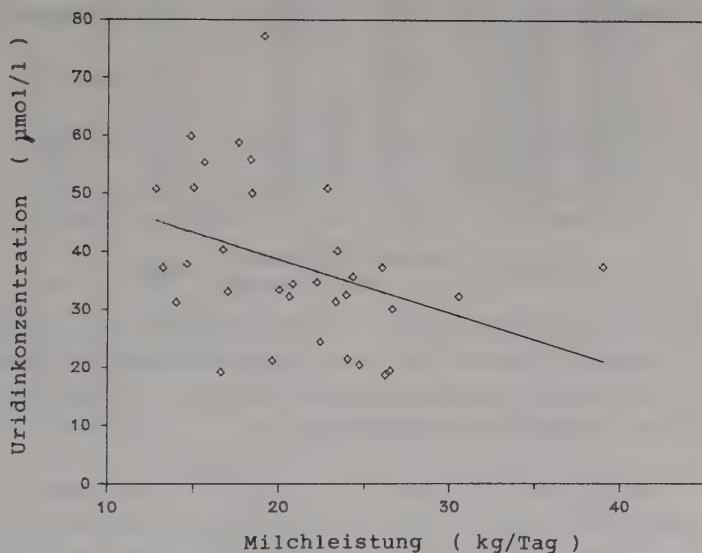


Abbildung 16: Uridinkonzentration (y , $\mu\text{mol/l}$) in der Milch von Deutsch-Fleckvieh-Kühen in Abhängigkeit von der Milchleistung (x , kg Milch/Tag)

$$y = 57.2 - 0.928 x$$

$$r = -0.373$$

$$n = 33, p < 0.05$$

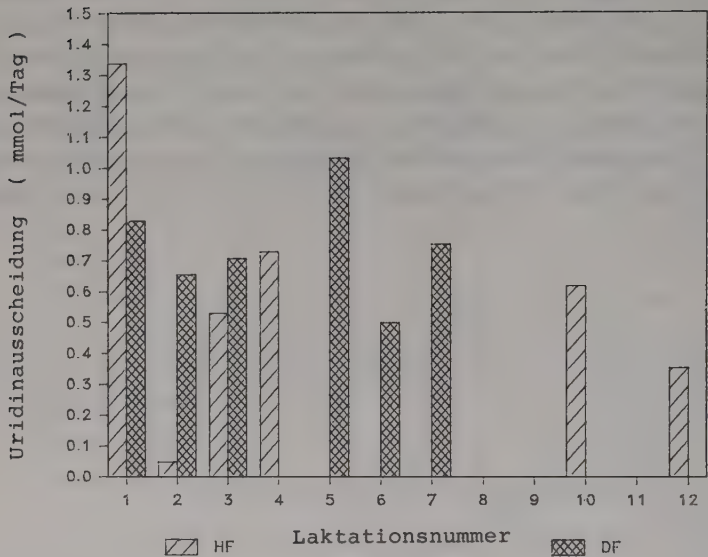


Abbildung 17: Tägliche Uridinausscheidung über die Milch von Holstein-Friesian- (HF) und Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) mit vergleichbarem Laktationsstadium in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen

Die tägliche Uridinausscheidung über die Milch (vgl. Abbildung 17, Tabelle 12) in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen verhielt sich mit Ausnahme bei den Tieren in der ersten Laktation wie die Milchleistung in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen (vgl. Abbildung 5). Primipare Tiere gaben relativ mehr Uridin über die Milch ab als multipare Tiere.

Tabelle 12: Tägliche Uridinausscheidung über die Milch in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen

	Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
Uridinausscheidung (mmol/Tag)		
vergleichbares Laktationsstadium:		
1. Laktation	1.34 $\pm$ 0.67 (n=5)	0.83 $\pm$ 0.30 (n=11)
2. Laktation	0.05 (n=1)	0.66 $\pm$ 0.20 (n=11)
3. Laktation	0.53 $\pm$ 0.27 (n=5)	0.71 $\pm$ 0.22 (n=6)
4. Laktation	0.73 $\pm$ 0.21 (n=2)	keine Proben
5. Laktation	keine Proben	1.03 $\pm$ 0.54 (n=2)
6. Laktation	"	0.50 $\pm$ 0.002 (n=2)
7. Laktation	"	0.75 (n=1)
10. Laktation	0.62 (n=1)	keine Proben
12. Laktation	0.35 (n=1)	"
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:		
1. Laktation	0.19 $\pm$ 0.09 (n=6)	keine Proben
3. Laktation	0.32 $\pm$ 0.25 (n=3)	"
4. Laktation	0.15 (n=1)	"
6. Laktation	0.11 (n=1)	"

Den stärksten Einfluß auf die Uridinabgabe über die Milch hatte die Milchleistung (vgl. Abbildung 18 bis Abbildung 20).

Bei den Holstein-Friesian-Kühen (vgl. Abbildung 18) in der ersten Laktation stieg die Uridinabgabe über die Milch bei einer Verdoppelung der Milchleistung von 15 auf 30 kg/Tag um das 7.6-fache von 0.279 auf 2.124 mmol/Tag. Die multiparen Tiere derselben Rasse wiesen bei einem Anstieg der Milchleistung von 15 auf 30 kg/Tag eine um das 3.3-fache angestiegene Uridinausscheidung auf (0.152 bzw. 0.497 mmol/Tag bei einer Milchleistung von 15 bzw. 30 kg/Tag).

Gleichartig unterschieden sich primipare und multipare Deutsch-Fleckvieh-Kühe (vgl. Abbildung 19). Bei dieser Rasse zeigten Tiere in der ersten Laktation bei einer Verdoppelung der Milchleistung von 15 auf 30 kg/Tag eine 2.7-fach höhere Uridinausscheidung über die Milch (0.682 bzw. 1.837 mmol/Tag bei einer Milchleistung von 15 bzw. 30 kg/Tag). Bei den multiparen Fleckvieh-Kühen stieg die Uridinausscheidung über die Milch von 0.483 mmol/Tag (bei 15 kg Milch /Tag) auf 0.888 mmol/Tag (bei 30 kg Milch /Tag). Damit bewirkte eine Verdoppelung der Milchleistung nur eine 1.8-fache Steigerung der Uridinausscheidung. Jedoch wies die Korrelation zwischen Uridinausscheidung über die Milch und Milchleistung bei diesen Tieren den niedrigsten Regressionskoeffizienten ($r=0.608$) auf. Der Unterschied zwischen der Regressionsgeraden (zwischen Milchleistung und Uridinausscheidung über die Milch) der multiparen Deutsch-Fleckvieh-Kühe und der entsprechenden Regressionsgeraden der multiparen Holstein-Friesian-Kühe konnte statistisch nicht gesichert werden. Alle anderen entsprechenden Regressions-

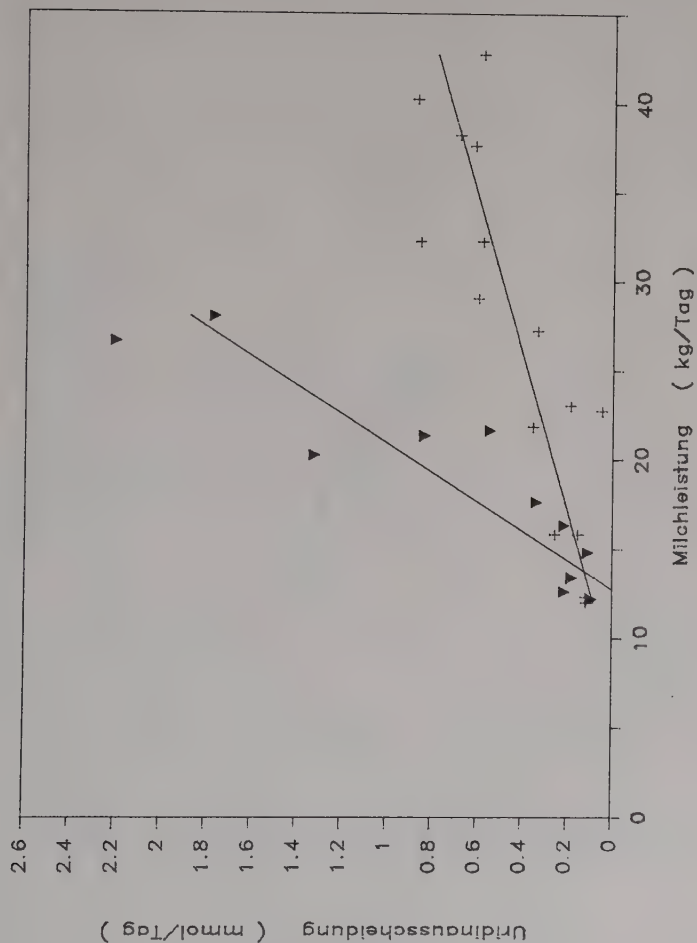


Abbildung 18:

Uridinausscheidung (y,
mmol/Tag) mit der Milch
in Abhängigkeit von der
Milchleistung (x,
kg/Tag) bei primiparen
(▼) und multiparen (+)
Holstein-Friesian-Kühen:

59

Primipara:

$$y = -1.566 + 0.123 x$$

$$r = 0.904$$

$$n = 11$$

$$p < 0.001$$

Multipara:

$$y = -0.193 + 0.023 x$$

$$r = 0.848$$

$$n = 15$$

$$p < 0.001$$

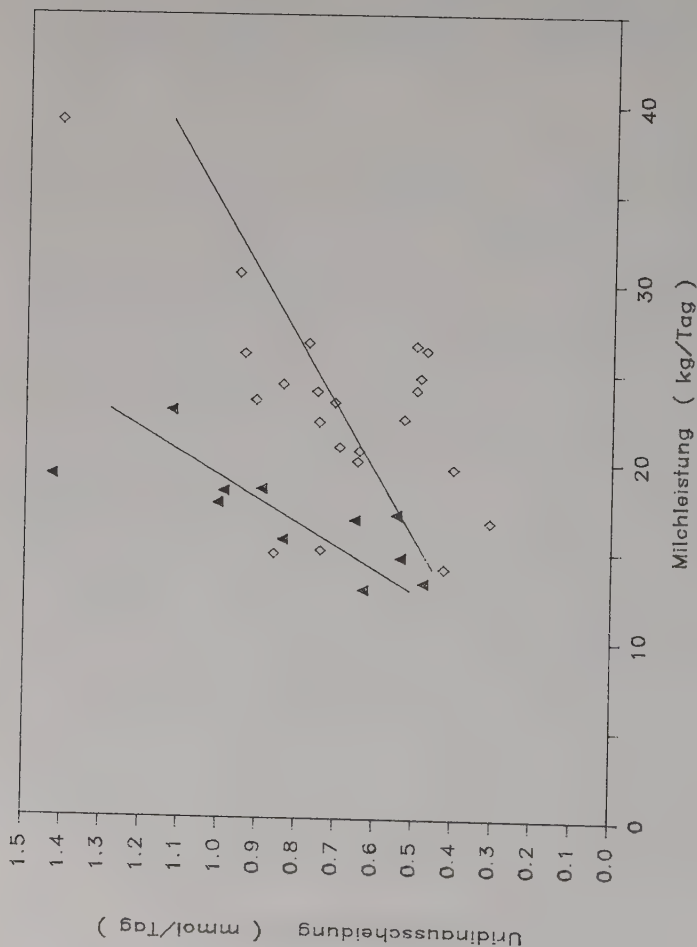


Abbildung 19:

Uridinausscheidung (y,
mmol/Tag) mit der Milch
in Abhängigkeit von der
Milchleistung (x,
kg/Tag) bei primiparen
(▲) und multiparen (◇)
Deutsch-Fleckvieh-Kühen:

Primipara:

$$y = -0.473 + 0.077 x$$

$$r = 0.747$$

$$n = 11$$

$$p < 0.01$$

Multipara:

$$y = 0.078 + 0.027 x$$

$$r = 0.608$$

$$n = 22$$

$$p < 0.01$$

geraden (vgl. Tabelle 13) unterschieden sich signifikant.

Tabelle 13: Regressionsgleichungen der Uridinausscheidung mit der Milch (y , mmol/Tag) auf die Milchleistung (x , kg/Tag)

y	=	a	$+b$	$*x$
primipare Holstein-Friesian-Kühe:				
y	=	-1.566^c	$+0.123^g$	$*x$
multipare Holstein-Friesian-Kühe:				
y	=	-0.193^d	$+0.023^h$	$*x$
primipare Deutsch-Fleckvieh-Kühe:				
y	=	-0.473^e	$+0.077^i$	$*x$
multipare Deutsch-Fleckvieh-Kühe:				
y	=	$+0.078^f$	$+0.027^j$	$*x$

$c : d \quad p < 0.0001$

$g : h$ nicht signifikant

$e : f \quad p < 0.02$

$i : j$ nicht signifikant

$c : e \quad p < 0.001$

$g : i$ nicht signifikant

$d : f$ nicht signifikant

$h : j$ nicht signifikant

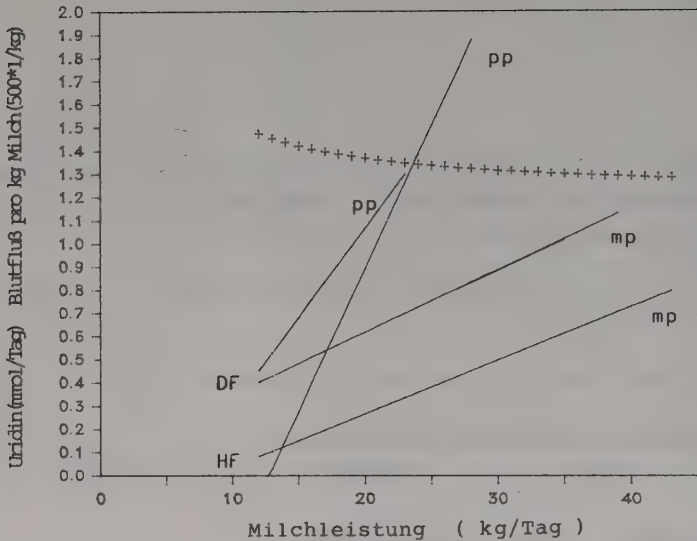


Abbildung 20: Uridinausscheidung über die Milch (y, mmol/Tag) von primiparen Holstein-Friesian-Kühen (HFpp), multiparen Holstein-Friesian-Kühen (HFmp), von primiparen Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DFpp) und von multiparen Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DFmp) in Abhängigkeit von der Milchleistung (x, kg/Tag). Berechneter Blutfluß (BF, vgl. Diskussion 4.1., +) durch die Milchdrüse (y, 500*1/Tag *kg Milch) in Abhängigkeit von der Milchleistung.

Der Anstieg der Uridinausscheidung mit zunehmender Milchleistung bei den multiparen Tieren könnte auf eine konstante Sekretion des Uridins pro kg Milch zurückzuführen sein. Der steilere Anstieg der Uridinausscheidung in Abhängigkeit von der Milchleistung bei den primiparen

Tieren, der bei den Holstein-Friesian-Kühen ausgeprägter war als bei den Deutsch-Fleckvieh-Kühen, kann damit nicht erklärt werden.

Uridin, das in Form von Uridintriphosphat zur Aktivierung von Glucose für die Laktosesynthese benötigt wird, könnte in Form von Uridinmonophosphat mit den Golgi-vesikeln in die Milch gelangen.

3.1.3. Cytidin

Die Cytidinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian-Kühen in vergleichbarem Laktationsstadium betrug $7.0 \pm 2.3 \mu\text{mol/l}$. Im späteren Laktationsabschnitt wiesen sie mit $6.3 \pm 2.0 \mu\text{mol/l}$ vergleichbare Konzentrationen auf. Die Deutsch-Fleckvieh-Kühe hatten $6.6 \pm 2.7 \mu\text{mol/l}$ (vgl. Tabelle 14) Cytidin in der Milch. Die Cytidinkonzentration in der Milch war unabhängig von der Milchleistung und vom Laktationsstadium.

Tabelle 14: Cytidinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühen

Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
$\mu\text{mol/l}$	
vergleichbares Laktationsstadium:	
7.0 ± 2.3 (n = 15)	6.6 ± 2.7 (n = 33)
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:	
6.3 ± 2.0 (n = 11)	keine Proben

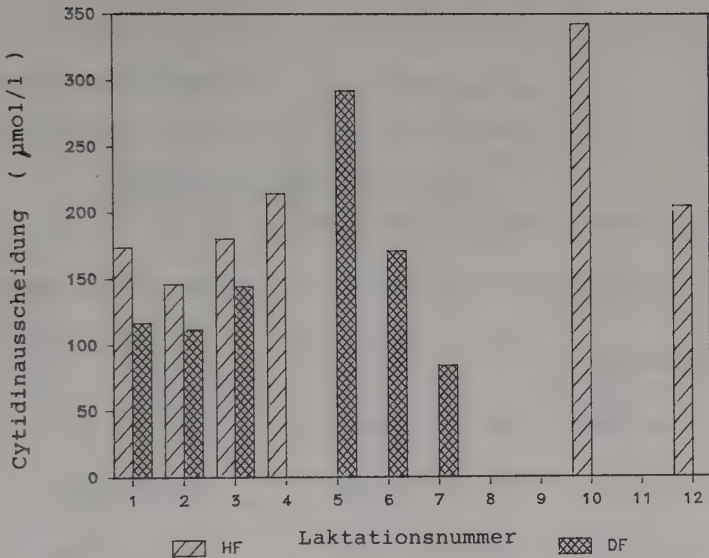


Abbildung 21: Tägliche Cytidinausscheidung über die Milch von Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühen mit vergleichbarem Laktationsstadium in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen.

Die tägliche Cytidinausscheidung über die Milch (vgl. Abbildung 21 und Tabelle 15) in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen glich dem Verlauf der Milchleistung in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen (vgl. Abbildung 5). Dies beruht auf einer gleichbleibenden Cytidinabgabe pro Liter sezernierter Milch. Mit zunehmender Milchleistung steigt die täglich sezernierte Cytidinmenge an (Abbildung 22).

Tabelle 15: Tägliche Cytidinausscheidung in der Milch in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen

	Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
Cytidinausscheidung (umol/Tag)		
vergleichbares Laktationsstadium:		
1. Laktation	174 $\pm$ 82 (n=5)	117 $\pm$ 43 (n=11)
2. Laktation	146 (n=1)	112 $\pm$ 43 (n=11)
3. Laktation	180 $\pm$ 37 (n=5)	144 $\pm$ 66 (n=6)
4. Laktation	215 $\pm$ 59 (n=2)	keine Proben
5. Laktation	keine Proben	292 $\pm$ 187 (n=2)
6. Laktation	"	171 $\pm$ 49 (n=2)
7. Laktation	"	84 (n=1)
10. Laktation	325 (n=1)	keine Proben
12. Laktation	205 (n=1)	"
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:		
1. Laktation	84 $\pm$ 28 (n=6)	keine Proben
3. Laktation	94 $\pm$ 32 (n=3)	"
4. Laktation	143 (n=1)	"
6. Laktation	89 (n=1)	"

Abbildung 22:

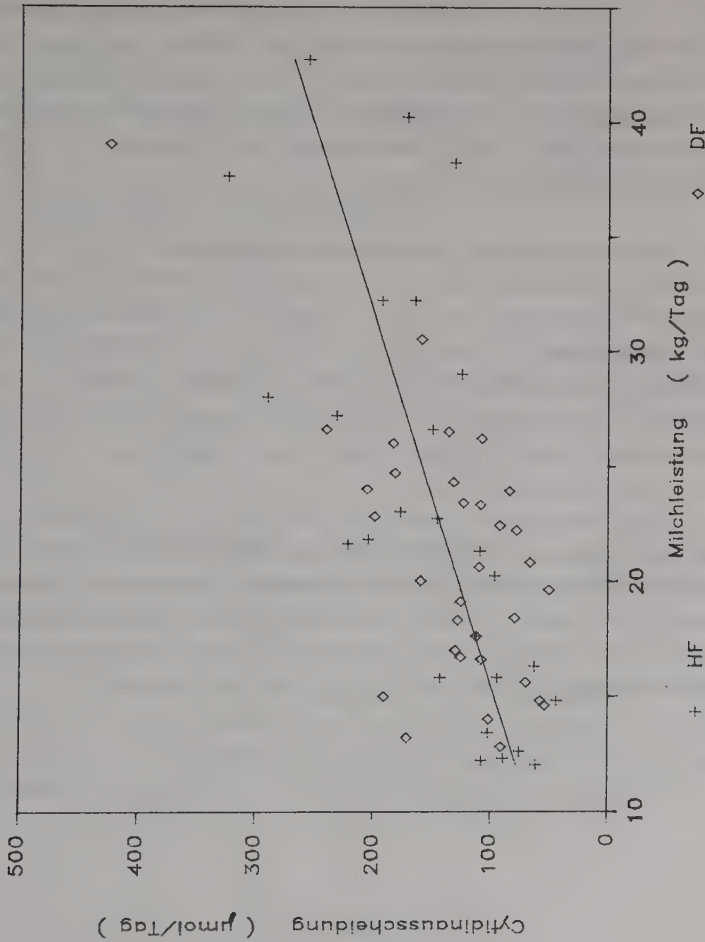
Cytidinausscheidung (Y, $\mu\text{mol}/\text{Tag}$) mit der Milch von Holstein-Friesian-Kühen (+) und Deutsch-Fleckvieh-Kühen ($\diamond$) in Abhängigkeit von der Milchleistung (X, kg/Tag):

$$Y = 3.204 + 6.236 X$$

$$r = 0.658$$

$$n = 59$$

$$p < 0.001$$



3.2. Purine und Purinmetaboliten

3.2.1. Hypoxanthin und Xanthin

Hypoxanthin und Xanthin wurden in der Milch von beiden untersuchten Rinderrassen in sehr niedrigen Konzentrationen nachgewiesen. Der Hypoxanthingehalt betrug etwa 7 $\mu\text{mol/l}$ (vgl. Tabelle 16). Dabei war der Variationskoeffizient der Konzentration des Hypoxanthins bei den Fleckvieh-Kühen mit 49% signifikant höher als bei den Holstein-Friesian-Kühen. Dies könnte auf die längere Transportzeit der Milchproben der Fleckvieh-Kühe von der Probennahme bis zum Einfrieren der Proben im Labor zurückzuführen sein (siehe 1.1.2.).

Die Hypoxanthin- und Xanthinkonzentrationen werden, wie Zugaben dieser Metaboliten zu nativer Kuhmilch zeigten (siehe Methodenteil 2.4.3.), durch die Aktivität der Xanthinoxidase, entweder schon in der Milchdrüsenzelle oder erst in der Milch, auf ein niedriges Niveau eingestellt.

Zum Zeitpunkt der Messung der Milchproben der Holstein-Friesian-Kühe war die Analysenmethode noch nicht so weit entwickelt, daß Xanthin in allen Proben bestimmt werden konnte. In der Milch der Fleckvieh-Kühe lag Xanthin in einer Konzentration von $1.25 \pm 0.72 \mu\text{mol/l}$ vor.

Tabelle 16: Hypoxanthin- und Xanthinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian- und Fleckvieh-Kühen

	Hypoxanthin	Xanthin
	$\mu\text{mol/l}$	
Holstein-Friesian		
	6.59 $\pm$ 1.50 (n=24)	nicht bestimmt
Deutsch-Fleckvieh		
	7.47 $\pm$ 3.67* (n=30)	1.25 $\pm$ 0.72 (n=24)

* signifikant ($p < 0.001$) höher

Drei Fleckvieh-Kühe, die am Tag der Probennahme brünstig waren, lagen mit einer durchschnittlichen Hypoxanthinkonzentration von 20.15 $\pm$ 14.42 $\mu\text{mol/l}$ signifikant höher ($p < 0.001$) als alle übrigen Kühe. Bei diesen Kühen war auch die Xanthinkonzentration in der Milch mit 3.86 $\pm$ 3.62 $\mu\text{mol/l}$ signifikant höher bei den nicht brünstigen Tieren.

Unterschiedliche Milchleistungen, Laktationsstadien und Zahl der Laktationen hatten keinen Einfluß auf die Hypoxanthin- und Xanthinkonzentrationen in der Milch der untersuchten Holstein-Friesian- und Fleckvieh-Kühe.

3.2.2. Harnsäure

Die Konzentration der Harnsäure in der Milch (vgl. Tabelle 17) der Holstein-Friesian-Kühe mit vergleichbarem Laktationsstadium war mit $180 \pm 54 \mu\text{mol/l}$ signifikant höher als in der Milch der Deutsch-Fleckvieh-Kühe ($129 \pm 39 \mu\text{mol/l}$). Holstein-Friesian-Kühe in späterem Laktationsstadium hatten $174 \pm 42 \mu\text{mol/l}$ Harnsäure in der Milch.

Tabelle 17: Harnsäurekonzentration in der Milch von Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühen

Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
$\mu\text{mol/l}$	
vergleichbares Laktationsstadium:	
180 ± 54 (n = 15)	* 129 ± 39 (n = 33)
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:	
174 ± 42 (n = 11)	keine Proben

* signifikant ($p < 0.0001$) niedriger als bei HF

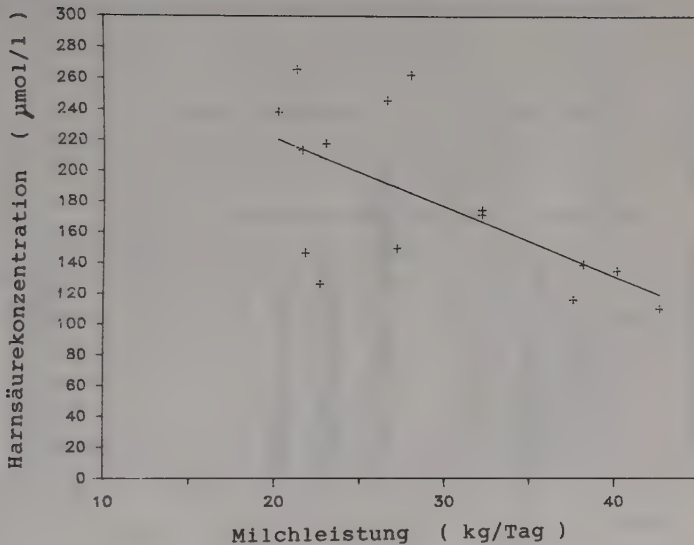


Abbildung 23: Harnsäurekonzentration (y , $\mu\text{mol/l}$) in der Milch von Holstein-Friesian-Kühen mit vergleichbarem Laktationsstadium in Abhängigkeit von der Milchleistung (x , kg Milch/Tag)

$$y = 311.3 - 4.5 x$$

$$r = -0.627, n = 15$$

$$p < 0.05$$

Die Konzentration der Harnsäure in der Milch nahm bei den Holstein-Friesian-Kühen im vergleichbaren Laktationsstadium mit zunehmender Milchleistung ab (vgl. Abbildung 23). Diese Abhängigkeit war bei den Holstein-Friesian-Kühen im späten Laktationsstadium und bei den Deutsch-Fleckviehkühen nicht vorhanden.

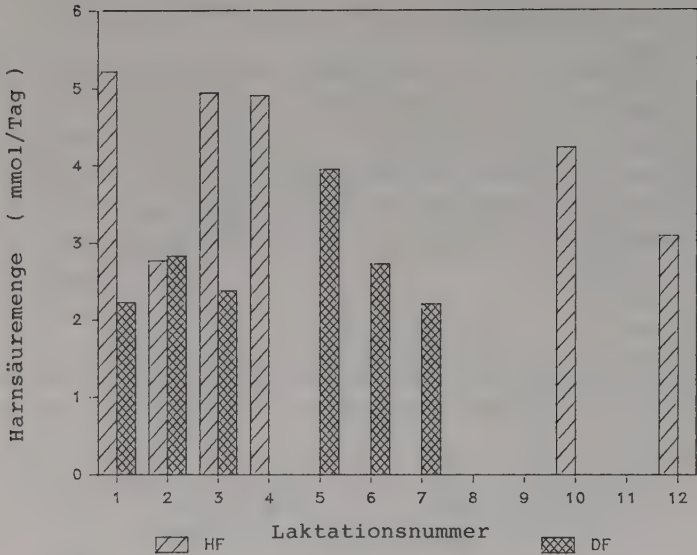


Abbildung 24: Tägliche Harnsäureausscheidung über die Milch von Holstein-Friesian- (HF) und Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) mit vergleichbarem Laktationsstadium in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen

Die tägliche Harnsäureausscheidung über die Milch zeigen Abbildung 24 und Tabelle 18. Beim Vergleich mit Abbildung 3 (Milchleistung in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen) fällt insbesondere bei der Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) die Ähnlichkeit des Verlaufes auf. Von der ersten bis zur fünften Laktation wird mit zunehmender Laktationsnummer mehr Milch sekretiert und zunehmende Mengen Harnsäure über die Milch abgegeben. Mit weiter steigender Laktationsnummer wird weniger Milch und weniger Harnsäure sekretiert.

Tabelle 18: Tägliche Harnsäureausscheidung über die Milch in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen

	Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
Harnsäureausscheidung (mmol/Tag)		
vergleichbares Laktationsstadium:		
1. Laktation	5.62 $\pm$ 1.12 (n=5)	2.23 $\pm$ 0.74 (n=11)
2. Laktation	2.77 (n=1)	2.83 $\pm$ 1.03 (n=11)
3. Laktation	4.94 $\pm$ 0.61 (n=5)	2.39 $\pm$ 0.62 (n=6)
4. Laktation	4.91 $\pm$ 0.49 (n=2)	keine Proben
5. Laktation	keine Proben	3.95 $\pm$ 2.85 (n=2)
6. Laktation	"	2.73 $\pm$ 1.33 (n=2)
7. Laktation	"	2.22 (n=1)
10.Laktation	4.23 (n=1)	keine Proben
12.Laktation	3.09 (n=1)	"
späteres, unterschiedliches Laktationsstadium:		
1. Laktation	2.44 $\pm$ 0.73 (n=6)	keine Proben
3. Laktation	3.47 $\pm$ 2.26 (n=3)	"
4. Laktation	3.10 (n=1)	"
6. Laktation	1.49 (n=1)	"

Bei den Holstein-Friesian-Kühen unterschieden sich die Tiere in der ersten Laktation deutlich. Sie hatten bei deutlich niedrigerer Milchleistung als die Tiere in der dritten Laktation eine vergleichbar hohe tägliche Harnsäureausscheidung über die Milch. Deshalb müssen sie bei der Betrachtung der täglichen Harnsäureabgabe über die Milch (Abbildung 25 bis 28) von den multiparen Tieren getrennt betrachtet werden. Der Unterschied dürfte auf die relativ höhere Stoffwechselleistung der Milchdrüse der primiparen Tiere zurückzuführen sein. Primipara haben bei gleicher Milchleistung wie Multipara kleinere Euter.

Bei den Deutsch-Fleckvieh-Kühen, welche die geringste Harnsäureausscheidung aufwiesen, wurde kein Unterschied zwischen primiparen und multiparen Tieren deutlich (Abbildung 27).

Der Verlauf der Harnsäureausscheidung in Abhängigkeit von der Milchleistung war bei allen untersuchten Gruppen gleich. Mit zunehmender Milchleistung bis zu 20kg Milch pro Tag stieg die Harnsäureausscheidung steil an. Dieser Anstieg flachte sich bei Milchleistungen zwischen 20kg und 30kg pro Tag ab. Bei Milchleistungen von über 30kg pro Tag, dies wurde vor allem bei den multiparen Holstein-Friesian-Kühen deutlich (vergleiche Abbildung 26), blieb die Harnsäureausscheidung konstant auf einem hohen Niveau.

Abbildung 25:

Harnsäureausscheidung
(y, mmol/Tag) über die
Milch von primiparen
Holstein-Friesian-Kühen
(+) in Abhängigkeit von
der Milchleistung (x,
kg/Tag):

$$y = -2.237 - 0.329 x$$

$$r = 0.955$$

$$n = 11$$

$$p < 0.001$$

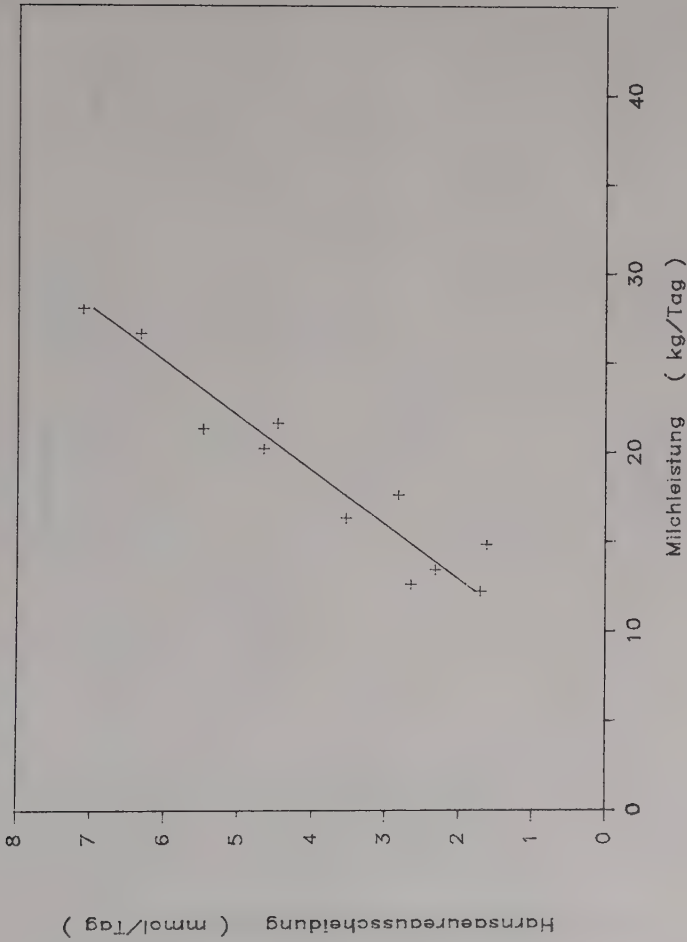


Abbildung 26:

Harnsäureausscheidung
(Y, mmol/Tag) über die
Milch von multiparen
Holstein-Friesian-Kühen
(+) in Abhängigkeit von
der Milchleistung (x,
kg/Tag):

$$Y = 6.576 - 59.196 / x$$

$$n = 15$$

nach linearer Trans-
formation:

$$r = 0.830$$

$$p < 0.001$$

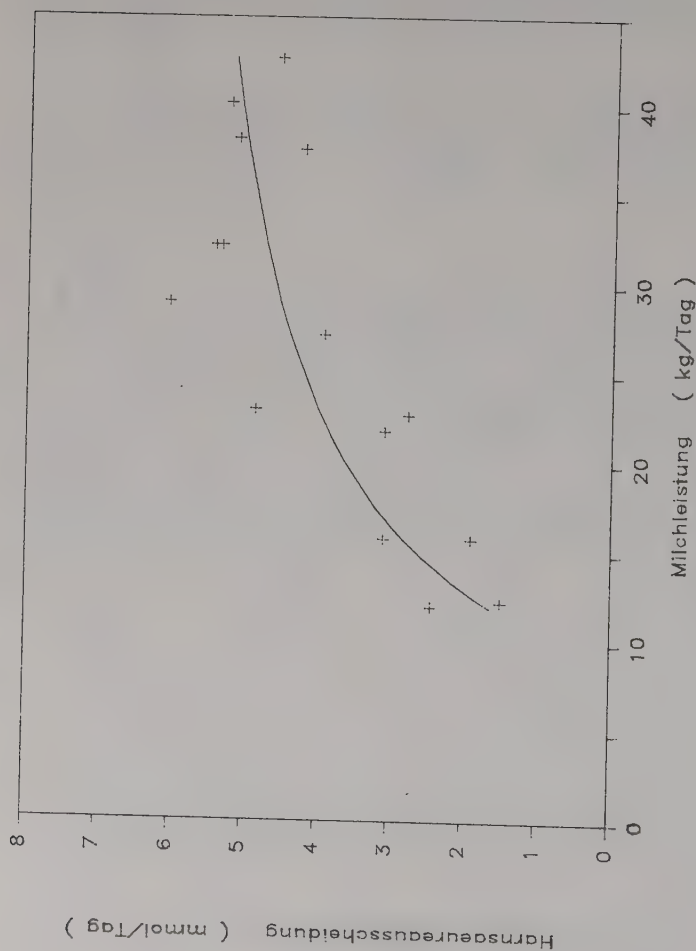
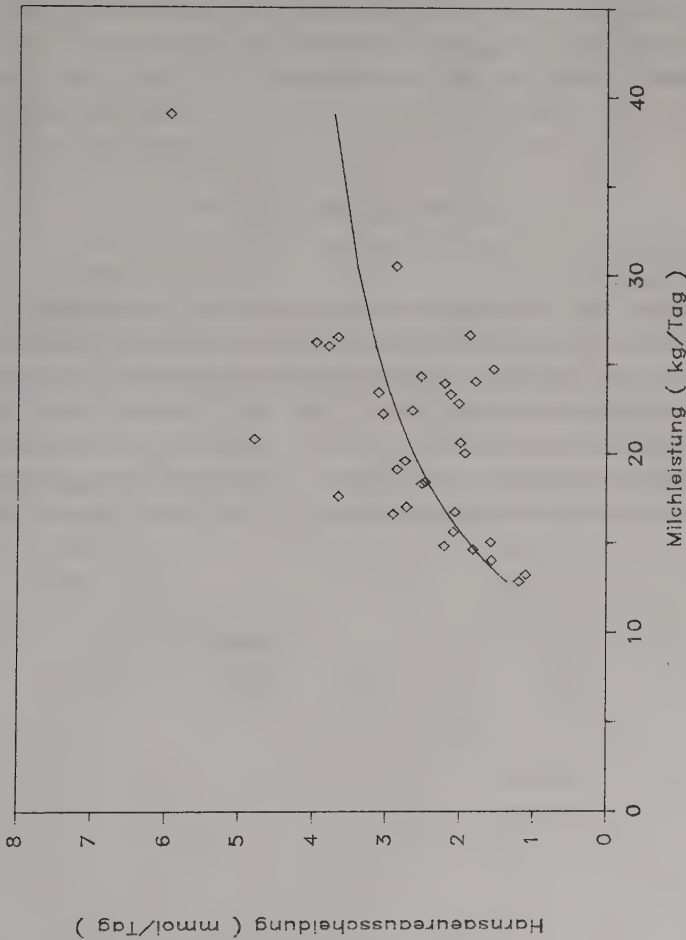


Abbildung 27:

Harnsäureausscheidung
(Y, mmol/Tag) mit der
Milch von Deutsch-
Fleckvieh-Kühen in
Abhängigkeit von der
Milchleistung (X,
kg/Tag):

$Y = 4.895 - 45.181 / X$
n = 33
nach linearer Trans-
formation:
 $r = -0.568$
 $p < 0.001$



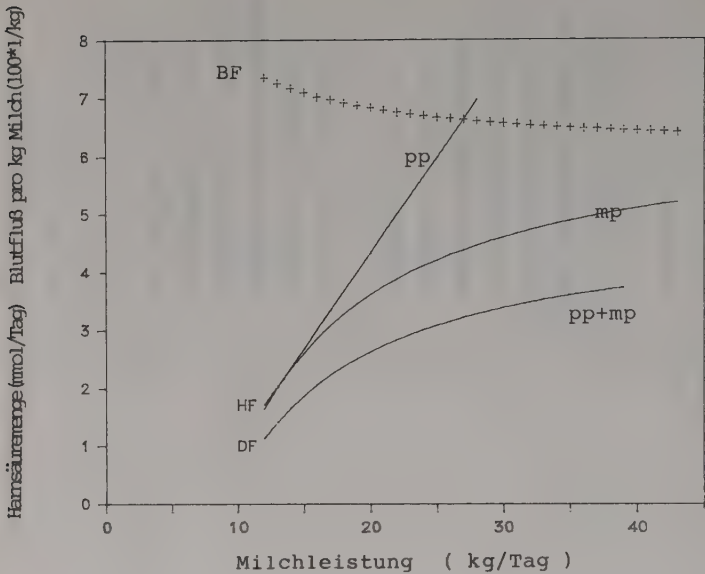


Abbildung 28: Harnsäureausscheidung über die Milch (y , mmol/Tag) von primiparen Holstein-Friesian-Kühen (HFpp), multiparen Holstein-Friesian-Kühen (HFmp) und von Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) in Abhängigkeit von der Milchleistung (x , kg/Tag). Blutfluß (BF, Kapitel 4.1., +) durch die Milchdrüse ($y, 100 \cdot 1/\text{Tag} \cdot \text{kg Milch}$) in Abhängigkeit von der Milchleistung.

$$\text{HFpp: } y = -2.237 - 0.329 \cdot x \quad \text{signifikant unterscheiden sich:}$$

$$\text{HFmp: } y = 6.576 - 59.196^a/x \quad b:a (p < 0.0001)$$

$$\text{DF : } y = 4.895 - 45.181^b/x$$

$$\text{BF : } y = 605 + 1570 / x$$

3.2.3. Allantoin

Die Milch der untersuchten Holstein-Friesian-Kühe enthielt mit $659 \pm 155 \mu\text{mol/l}$ ($n=26$) mehr Allantoin ($p < 0.0001$) als die Milch der Deutsch-Fleckvieh-Kühe mit $264 \pm 50 \mu\text{mol/l}$ ($n= 26$).

Die Milchleistung beeinflusste die Allantoinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian-Kühen und Fleckvieh-Kühen unterschiedlich. Während sie bei den Holstein-Friesian-Kühen mit zunehmender Milchleistung abnahm, stieg sie bei den Fleckvieh-Kühen mit zunehmender Milchleistung an.

Die Milch der Holstein-Friesian-Kühe hatte bei einem Leistungsniveau von 10 - 20 kg Milch pro Tag einen mittleren Allantoingehalt von $802 \mu\text{mol/l}$. Die Deutsch-Fleckvieh-Kühe hatten mit $244 \mu\text{mol/l}$ um 70 % weniger ($p < 0.0001$) Allantoin in der Milch. Bei einem Leistungsniveau von 30 - 40 kg Milch pro Tag betrug der Unterschied zwischen Holstein-Friesian- und Fleckvieh-kühen noch 33 % , konnte aber aufgrund der geringen Zahl der Fleckviehkühe mit so hoher Milchleistung statistisch nicht mehr abgesichert werden (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Allantoinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühen bei unterschiedlichem Leistungsniveau

Milchleistung	10 - 20	30 - 40
	kg / Tag	
	$\mu\text{mol} / \text{l}$	
Holstein-Friesian		
	802 ± 122	497 ± 46
	a (n=10)	b (n=6)
Deutsch-Fleckvieh		
	244 ± 31	335 ± 77
	c (n=16)	d (n=2)

signifikant unterscheiden sich:

a:b ($p < 0.0001$)

c:d ($p < 0.01$)

a:c ($p < 0.0001$)

b:d ($p < 0.01$)

Der Verlauf der Allantoinkonzentration in der Milch der Holstein-Friesian-Kühe (y , $\mu\text{mol/l}$) in Abhängigkeit von der Milchleistung (x , kg/Tag) läßt sich durch eine Hyperbel beschreiben (vgl. Abbildung 29).

Diese Kurve gleicht dem Verlauf des Blutflusses durch die Milchdrüse pro sezerniertem Kilogramm Milch in Abhängigkeit von der Milchleistung (Abbildung 36).

Die Beziehung zwischen der Allantoinkonzentration in der Milch (y , $\mu\text{mol/l}$) und dem Blutfluß durch die Milchdrüse pro sezerniertem Kilogramm Milch (x , l/kg Milch) gibt die folgende Regressionsgerade wieder:

$$y = -1951 + 3.8 x$$

Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden ($r = 0.750$, $n = 26$) unterscheidet sich mit $p \leq 0.001$ von Null.

Die Allantoinkonzentration in der Milch der Fleckviehkühe (y , $\mu\text{mol/l}$) in Abhängigkeit von der Milchleistung (x , kg/Tag) läßt sich durch eine Gerade beschreiben:

$$y = 135 + 6 x$$

Der Anstieg des Allantoins in der Milch der Fleckviehkühe ist mit $p \leq 0.001$ ($r = 0.699$, $n = 27$) statistisch gesichert. Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Allantoinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian- und Fleckviehkühen in Abhängigkeit von der Milchleistung. Die größere Streuung der Einzelwerte um die berechnete Kurve bei den HF-Kühen ist durch die schlechtere analytische Präzision bedingt (vgl. Tabelle 7).

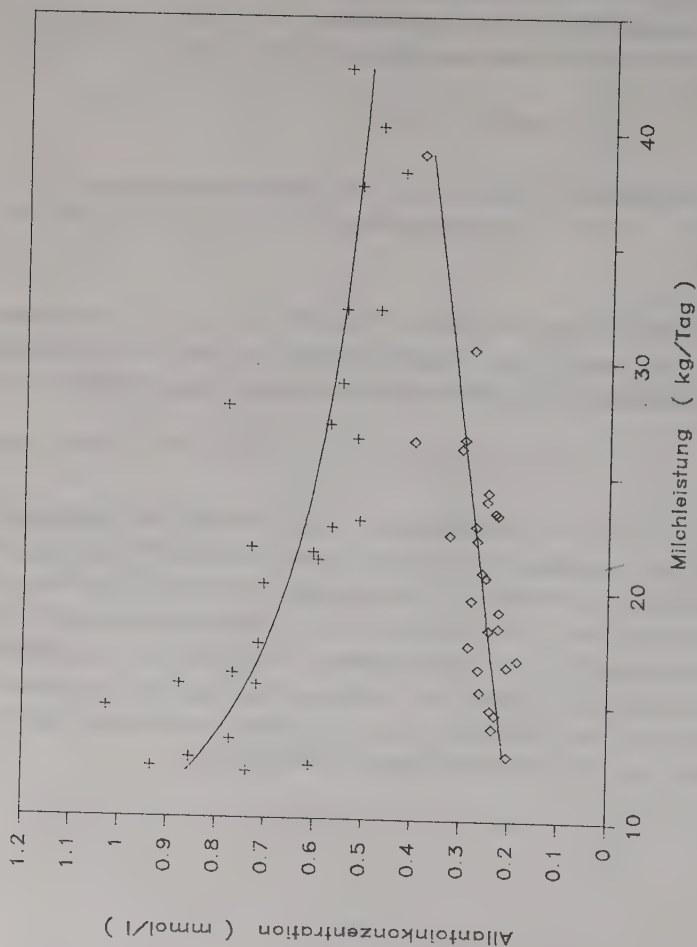


Abbildung 29:
Allantoinkonzentration
(y , mmol/l) in der
Milch in Abhängigkeit
von der Milchleistung
von Holstein-Friesian-
Kühen (+) (x , kg/Tag):
 $y = 0.360 + 5.997 / x$
 $n = 26$

nach linearer Trans-
formation:
 $r = 0.750$
 $p < 0.001$

und von Deutsch-Fleck-
vieh-Kühen (◇):

$y = 0.135 + 0.006 * x$
 $r = 0.699$
 $p < 0.001$
 $n = 27$

Bei der Betrachtung der Konzentration des Allantoins in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen wird bei den HF-Kühen deutlich, daß Kühe mit geringerer Milchleistung (1. und 12. Laktation) besonders hohe Allantoinkonzentrationen aufwiesen (Abbildung 30).

Bei den Holstein-Friesian-Kühen war die mittlere Allantoinkonzentration in der Milch in der ersten Laktation mit $753 \pm 150 \mu\text{mol/l}$ ($n=11$) signifikant höher ($p < 0.01$) als die Allantoinkonzentration in der 2. bis 10. Laktation ($580 \pm 121 \mu\text{mol/l}$, $n=14$). Im Gegensatz dazu war bei den Deutsch-Fleckvieh-Kühen die mittlere Allantoinkonzentration in der ersten Laktation mit $238 \pm 35 \mu\text{mol/l}$ ($n=10$) signifikant niedriger ($p < 0.02$) als in der zweiten bis 7. Laktation mit $279 \pm 52 \mu\text{mol/l}$ ($n=16$) (vgl. Abbildung 30).

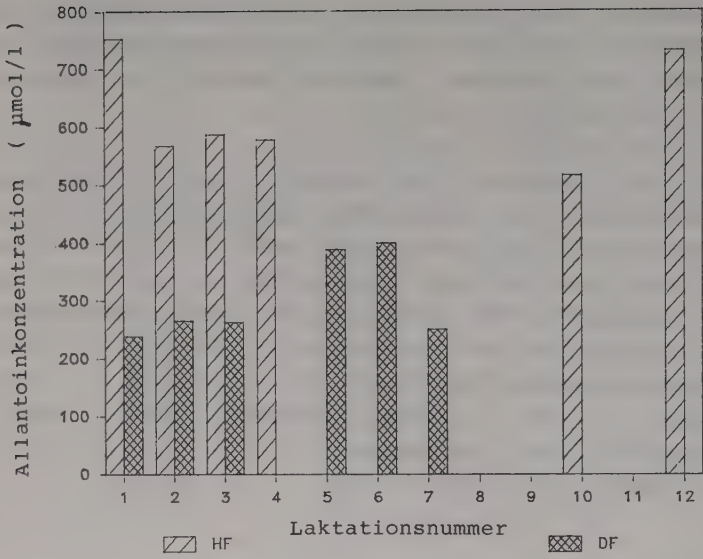


Abbildung 30: Mittelwerte der Allantoinkonzentration in der Milch von Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühen in Abhängigkeit von der Laktationsnummer.

Die tägliche Allantoinausscheidung mit der Milch (vgl. Abbildung 31) verlief wie die Milchleistung in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen.

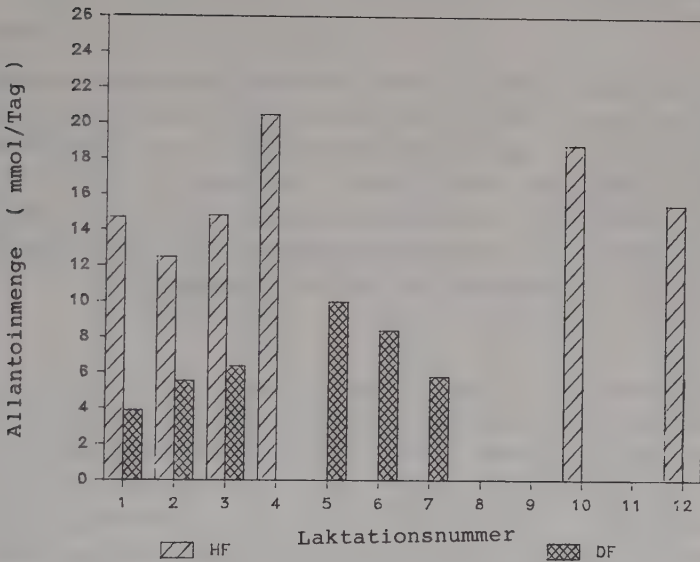


Abbildung 31: Mittlere tägliche Allantoinausscheidung über die Milch von Holstein-Friesian- (HF) und Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen

3.3. Seltene Basen und weitere Pyrimidine und Purine

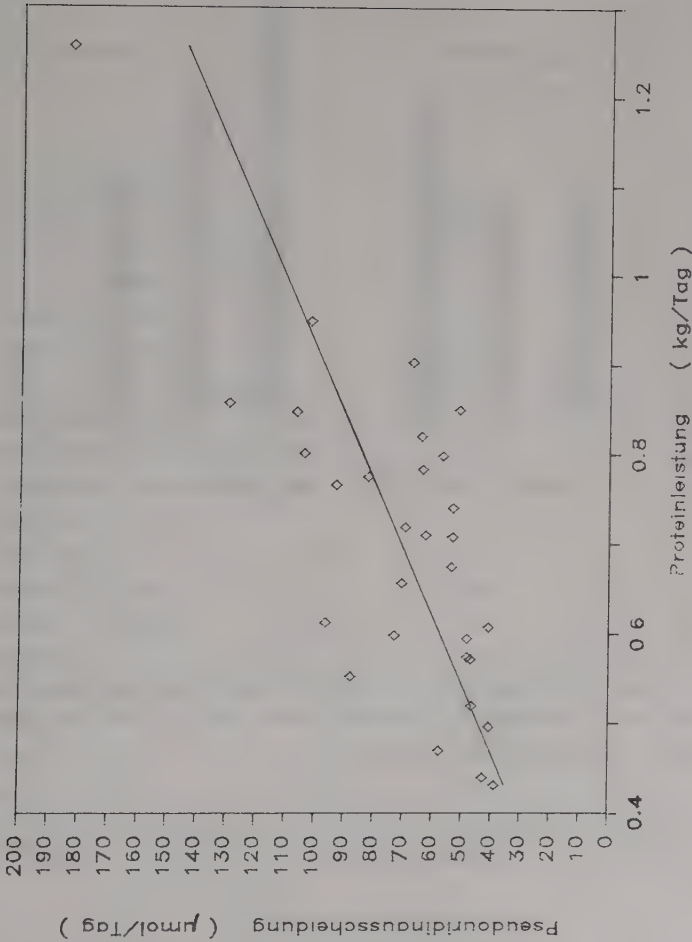
Die einzige seltene Base, die bei den vorliegenden Meßbedingungen regelmäßig in der Milch gemessen wurde, ist das Pseudouridin. Da es in jedem Transfer-RNS-Molekül vorkommt, ist es das am weitesten verbreitete modifizierte Nucleosid.

Pseudouridin wurde in der Milch einer Holstein-Friesian-Kuh mit einer Konzentration von $3.8 \mu\text{mol/l}$ gefunden. Aufgrund der geringeren Trennleistung der verwendeten Säule konnte es nicht in allen untersuchten Milchproben gemessen werden. Nachdem die Analytik weiter verbessert war, konnte bei den Deutsch-Fleckvieh-Kühen Pseudouridin in allen untersuchten Milchproben gemessen werden. Die Konzentration betrug in Mittel $3.3 \pm 0.9 \mu\text{mol/l}$.

Die Konzentration des Pseudouridins in der Milch der Fleckviehkühe blieb unbeeinflusst von der Milchleistung. Dies deutet darauf hin, daß die Milchdrüse konstante Mengen an Pseudouridin pro Liter synthetisierter Milch ausscheidet. Da Pseudouridin als Bestandteil der verschiedenen Ribonucleinsäuren für die Proteinsynthese benötigt wird, besteht ein enger Zusammenhang zwischen Pseudouridinausscheidung (y , $\mu\text{mol/l}$) mit der Milch und Proteinleistung (x , kg/Tag) der Milchdrüse (vgl. Abbildung 32).

Geht man von der noch zu beweisenden Voraussetzung aus, daß das Pseudouridin in der Milch allein aus der Milchdrüse stammt, dann kann man schließen, daß im Durchschnitt für 1 kg synthetisiertes Milchprotein $133 \mu\text{mol}$ Pseudouridin verbraucht werden.

Abbildung 32:
 Pseudouridinausscheidung
 in der Milch von
 Fleckviehkühen in
 Abhängigkeit von der
 Proteinleistung :
 $y = -22.3 + 133.3 x$
 $r = -0.745$
 $p < 0.001$
 $n = 30$



Da die Proteinleistung mit der Milchleistung eng korreliert ist, verläuft die Pseudouridinausscheidung über die Milch wie die Milchleistung in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen (vgl. Abbildung 33).

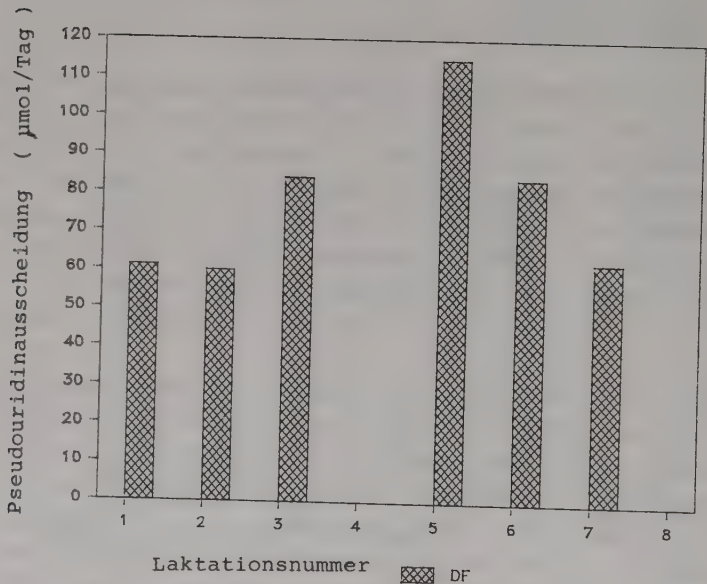


Abbildung 33: Tägliche Pseudouridinausscheidung über die Milch von Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) in Abhängigkeit von der Zahl der Laktationen.

Weitere in der Kuhmilch identifizierte seltene Basen, seltene Nucleoside, Pyrimidine und Purine sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Seltene Pyrimidine und Purine in der Milch von Deutsch-Fleckvieh- (DF) und Holstein-Friesian-Kühen (HF) (+ = nachgewiesen)

Verbindungen	DF Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	HF
seltene Nucleoside:		
1-Methyl-Inosin	3.1	+
5-Methyl-Cytidin	0.01	+
5-Methyl-Desoxycytidin	0.003	+
seltene Basen:		
2-Methyl-Guanin	0.3	+
7-Methyl-Guanin	0.01	+
Nucleotide:		
Cytidin 5'-Monophosphat	+	2.9
Guanosin-5'-Monophosphat	+	1.8
Nucleoside:		
Adenosin	0.9	+
Desoxy-Uridin	0.09	+
Desoxy-Cytidin	0.01	+
Thymidin	0.01	+
Desoxy-Guanosin	0.004	+
Basen:		
Guanin	+	6.5
Thymin	0.1	+

3.4. Übersicht über die Pyrimidine und Purine in der Rindermilch

Die über die Milch abgegebenen Mengen der Pyrimidine Orotsäure und Uridin waren unter sich und mit der

Tabelle 21: Korrelationen zwischen Orotsäure-, Uridin- und Harnsäureausscheidungen in der Milch

	r	p <	n
primipare HF-Kühe:			
Orotsäure/Uridin	+0.603	0.05	11
Harnsäure/Uridin	+0.898	0.001	11
multipare HF-Kühe:			
Orotsäure/Uridin	+0.519	0.05	15
Harnsäure/Uridin	+0.790	0.001	15
primipare und multipare HF-Kühe:			
Harnsäure/Orotsäure	+0.694	0.001	26
primipare DF-Kühe:			
Orotsäure/Uridin	+0.726	0.05	11
Harnsäure/Uridin	+0.570	nicht sig.	11
multipare DF-Kühe:			
Orotsäure/Uridin	+0.746	0.001	22
Harnsäure/Uridin	+0.477	0.05	22
primipare und multipare DF-Kühe:			
Harnsäure/Orotsäure	+0.634	0.001	33

Harnsäuremenge korreliert (vergleiche Tabelle 21). Dies weist auf eine gemeinsame Ursache oder gegenseitige Beeinflussung ihrer Ausscheidungsmengen in Abhängigkeit von der Milchleistung hin.

Die Unterschiede in den Ausscheidungsmengen der einzelnen Pyrimidin- und Purinverbindungen in der Milch der Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühe können durch die verschiedene Ernährung, die unterschiedliche Rasse oder unterschiedliche Haltungsbedingungen bedingt sein.

Um Differenzen auszuschließen, die auf Unterschiede in der Energieversorgung und Leistung zurückzuführen sind, muß man die Ausscheidungsmengen bei einer Milchleistung von 37 kg Milch/Tag vergleichen, da bei dieser Milchleistung die Energieversorgung der Tiere beider Rassen gleich war. Es deuten sich Unterschiede in den Mengen von Orotsäure, Uridin und Harnsäure an (vergleiche Tabelle 22). Diese Unterschiede können jedoch aufgrund der zu geringen Anzahl an Meßwerten bei den Deutsch-Fleckvieh-Kühen in diesem Leistungsniveau statistisch nicht abgesichert werden.

Tabelle 22: Berechnete Ausscheidungsmengen von Pyrimidinen und Purinen über die Milch (Laktationsstadium: 42 - 70 Tage) bei einer Milchleistung von 37 kg/Tag:

Verbindungen	HF-Kühe	DF-Kühe
mmol/Tag		
Orotsäure *	15.72	12.63
Uridin **	0.63	1.05
Cytidin	0.23	0.23
Pyrimidine insgesamt	16.58	13.91
Hypoxanthin	0.24	0.27
Xanthin	-	0.04
Harnsäure *	4.93	3.64
Purine insgesamt	5.17	3.95
seltenes Nucleosid:		
Pseudouridin	-	0.52
seltene Base:		
2-Methyl-Guanin	-	0.11

* nur multipare HF-Kühe

** nur multipare Kühe

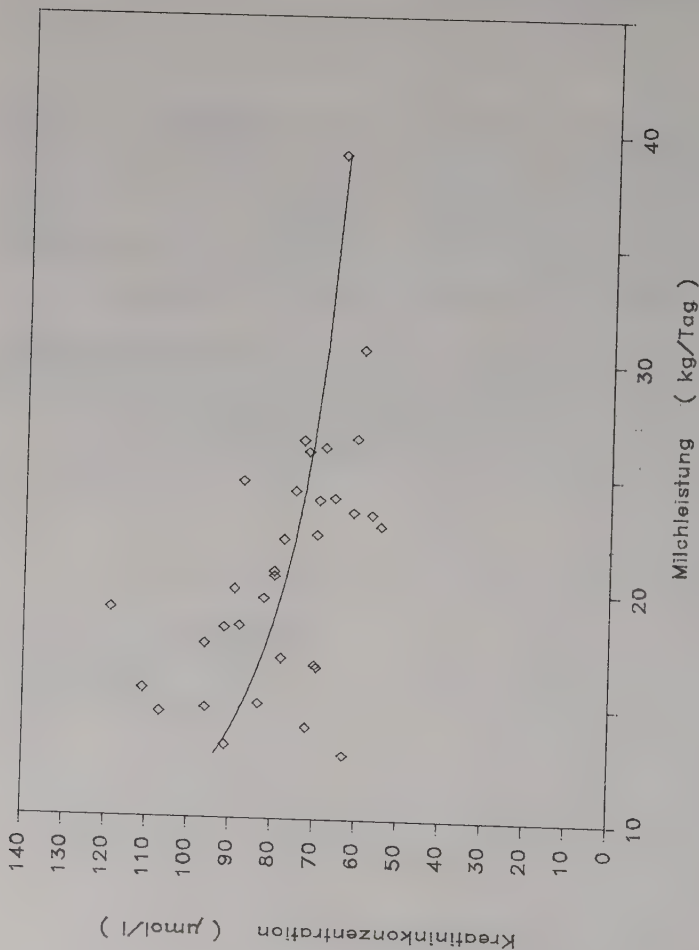
- nicht bestimmt

3.5. Kreatinin

Kreatinin und Hippursäure wurden in der Milch gemessen, um einen Bezugsparameter für Metaboliten zu haben, die aus dem Blut stammen. Da jedoch bei der vorliegenden Untersuchung die am Tag der Probenahme produzierte Milchmenge sehr genau bestimmt wurde, ließ sich in keinem Fall die Streuung durch Bezug auf Kreatinin oder Hippursäure reduzieren.

Kreatinin wurde nur in der Milch der Deutsch-Fleckvieh-Kühe bestimmt. Die mittlere Konzentration war $78 \pm 16 \mu\text{mol/l}$. Wie Abbildung 34 zeigt, sinkt mit ansteigender Milchleistung die Kreatininkonzentration in der Kuhmilch. Kreatinin ist als Metabolit des Muskelstoffwechsels nur von der Muskelmasse abhängig.

Wie für das Allantoin bei den Holstein-Friesian-Kühen ist die abnehmende Kreatininkonzentration mit zunehmender Milchleistung auf die sinkende Blutflußrate pro Liter sezernierter Milch zurückzuführen.



3.6. Hippursäure

Hippursäure stammt aus dem Leberstoffwechsel. Sie ist ein Entgiftungsprodukt von aus dem Pansen resorbierter Benzoessäure und anderen pflanzlichen Phenolverbindungen wie beispielsweise Toluol.

Die Konzentrationen der Hippursäure in der Milch (vgl. Tabelle 23) der Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühe unterschieden sich signifikant ($p < 0.0001$).

Tabelle 23: Konzentration der Hippursäure in der Milch von Holstein-Friesian- und Deutsch-Fleckvieh-Kühen

Holstein-Friesian	Deutsch-Fleckvieh
$\mu\text{mol/l}$	
75 ± 22 (n = 26)	$*128 \pm 36$ (n = 31)

* signifikant höher als bei HF-Kühen ($p < 0.0001$)

4. DISKUSSION

4.1. Erläuterung möglicher Zusammenhänge zwischen der Konzentration von Metaboliten in der Milch und der Milchleistung

Die Metaboliten in der Milch lassen sich bezüglich des Verlaufes ihrer Konzentration mit zunehmender Milchleistung in drei Gruppen einteilen:

Die Konzentration eines Metaboliten in der Milch nimmt mit zunehmender Milchleistung ab.

Die Konzentration eines Metaboliten in der Milch bleibt mit zunehmender Milchleistung gleich.

Die Konzentration eines Metaboliten in der Milch steigt mit zunehmender Milchleistung an.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sind alle drei beschriebenen Möglichkeiten verwirklicht. Um den Kausalzusammenhang, der diese Abhängigkeiten bedingt, erkennen zu können, ist die Kenntnis der Herkunft des betrachteten Metaboliten Voraussetzung. Es ist nicht ohne weiteres möglich, aus der Zuordnung zu einer der drei oben genannten Gruppen zu schließen, ob der entsprechende Metabolit aus dem Stoffwechsel der Milchdrüse oder aus dem Körperstoffwechsel stammt.

Metaboliten der Milchdrüse, deren Konzentrationen in der Milch bei ansteigender Milchleistung konstant bleiben (Hypoxanthin, Xanthin, Pseudouridin) werden mit zunehmender Milchleistung vermehrt mit der Milch ausgeschieden.

Metaboliten der Milchdrüse, deren Konzentrationen in der Milch mit zunehmender Milchleistung abfallen (Orotsäure, Harnsäure) können in gleichbleibender oder verminderter Menge mit der Milch abgegeben werden. Der Konzentrationsabfall könnte, bei gleichbleibender täglicher Ausscheidung über die Milch nur eine Folge der Verdünnung durch das erhöhte Milchvolumen sein. Will man dies beweisen, dann muß man die Ausscheidung des betreffenden Metaboliten über die Milch berechnen. Sie ist dann unabhängig von der Milchleistung.

Nachfolgend sollen Metaboliten des Körperstoffwechsels betrachtet werden. Der Verlauf ihrer Konzentration in der Milch hängt entscheidend von der Geschwindigkeit ab, mit der sie die Blut-Milch-Schranke überschreiten können.

Wenn der Austausch von Metaboliten über die Blut-Milch-Schranke nur langsam erfolgt (Allantoin), dann ist das Blutvolumen, das für jedes sezernierte Kilogramm Milch die Milchdrüse durchströmt, entscheidend für die Konzentration dieses Metaboliten in der Milch.

Nach Kronfeld (Kronfeld et al., 1968) besteht zwischen dem Blutfluß durch die Milchdrüse (y , l / Tag) und der Milchleistung (x , kg Milch / Tag) eine hochgesicherte ($r = 0.97$, $p < 0.001$) lineare Beziehung.

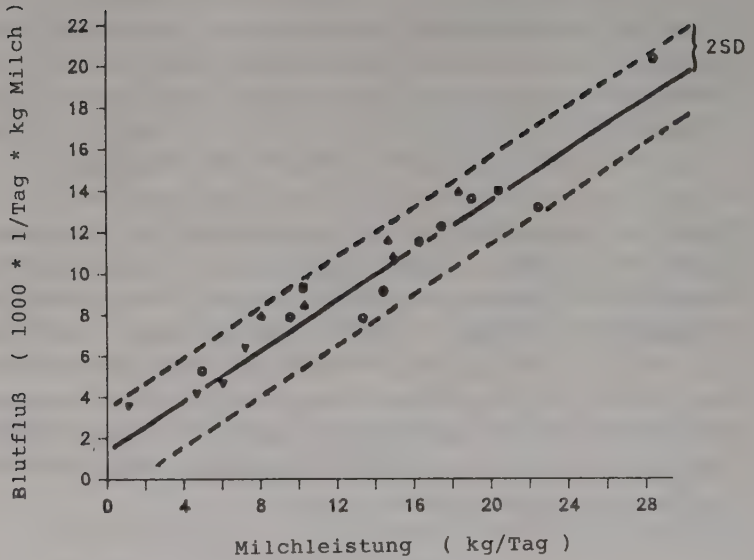


Abbildung 35: Abhängigkeit des Blutflusses pro Tag durch die Milchdrüse (y , l/Tag) von der Milchleistung (x , kg/Tag). (Nach Kronfeld et al., 1968) $y = 1570 + 605 x$

In Abbildung 35 ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt. Die Gerade schneidet die Ordinate bei 1570 l / Tag. Das heißt, daß durch ein trockenstehendes Euter, das vergleichbar groß wie ein durchschnittliches, laktierendes Euter ist, 1570 l Blut an einem Tag fließen. Für jedes produzierte Kilogramm Milch pro Tag fließen zusätzlich 605 Liter Blut pro Tag durch die Milchdrüse.

Die Konzentration eines Metaboliten in der Milch, der bei konstanter Poolgröße im Blut nur zu einem geringen Anteil vom Blut in die Milch übertritt, ist vom Blutvolumen abhängig, das pro Kilogramm Milch durch die Milchdrüse fließt. Nach Division der oben beschriebenen Gleichung durch die Milchleistung erhält man den Blutfluß pro Kilogramm produzierter Milch (y , l/kg Milch) in Abhängigkeit von der Milchleistung (x , kg Milch / Tag). Dieser in Abbildung 36 dargestellten Beziehung liegt eine Hyperbel zugrunde. Sie verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Metaboliten in der Milch in Abhängigkeit von der Milchleistung bei den oben angeführten Voraussetzungen.

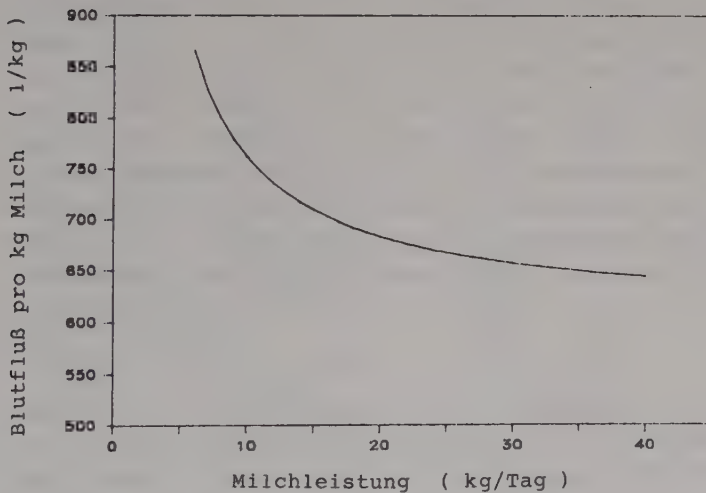


Abbildung 36: Abhängigkeit des Blutflusses pro Tag und Kilogramm sezernierter Milch (y , l/kg Milch) von der Milchleistung (x , kg/Tag). $y = 605 + 1570 / x$

Metaboliten des Körperstoffwechsels, die langsam in die Milch übergehen und mit zunehmender Milchleistung im Blut abfallen, fallen in der Milch mit zunehmender Milchleistung noch stärker ab, da ihr Konzentrationsverlauf in der Milch durch die in Abbildung 36 dargestellte Beziehung überlagert wird.

Aus demselben Grund können Metaboliten aus dem Körperstoffwechsel, die langsam in die Milch übergehen und mit zunehmender Milchleistung im Blut ansteigen, in der Milch in Abhängigkeit von der Milchleistung ansteigende oder gleichbleibende Konzentrationen aufweisen.

4.2. Einflüsse auf die Orotsäuresynthese in der Milchdrüse

Es gibt einige Hinweise dafür, daß die Orotsäure in der Milch allein aus der Milchdrüse stammt. In-vitro Versuche mit isolierten Mammozyten und Gewebeschnitten zeigten, daß Milchdrüsenzellen die Fähigkeit haben, Orotsäure im umgebenden Medium zu einer höheren als der intrazellulären Konzentration anzureichern (Larson, 1976, Ehle et al., 1981).

Auch die Ergebnisse eines in-vivo Experimentes von Motyl et al. (1986) weisen auf die ausschließliche Herkunft der Orotsäure in der Milch aus der Milchdrüse hin. Zum einen konnte er im Blutplasma laktierender Rinder eine Konzentration von $1.14 \pm 0.71 \mu\text{mol/l}$ und eine etwa 1000-fach höhere Konzentration der Orotsäure in der Milch messen. Ein Transport der Orotsäure gegen einen so großen Konzentrationsanstieg ist unwahrscheinlich. Andererseits hat Motyl durch eine mit Harnstoff ergänzte Ration die Ausscheidung der Orotsäure über die Niere gesteigert. Die Orotsäureausscheidung über die Milch blieb davon unbeeinflußt.

Ahmed et al. (1978) infundierten U-14-C-Aspartat, die metabolische Vorstufe von Orotsäure, in einen Zitzenkanal einer Ziege. Die deutlich höhere spezifische Aktivität der Orotsäure in der Milch dieser Drüsenhälfte bewies die Fähigkeit der Milchdrüse, Orotsäure zu synthetisieren.

Larson (1976) zeigte durch Zusatz von $^{14}\text{-C}$ -Orotsäure zu isolierten Mammozyten, daß ein Austausch der Orotsäure zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Pool der Drüsenzelle stattfinden kann.

Die Anreicherung der Orotsäure in der Milch über die Konzentration in der Milchdrüsenzelle hinaus (Larson, 1976, Ehle et al., 1981) könnte auf dem Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die Golgimembran zurückzuführen sein. Von Kuhn (Kuhn et al., 1980) wird der Aufbau eines Protonengradienten, wie er bei der inneren Membran des Mitochondrions bekannt ist, auch bei der Laktosesynthese (vgl. Abbildung 37) für die Membran der Golgivesikel postuliert. Die beim intrazellulären pH-Wert negativ geladene Orotsäure könnte, angetrieben durch die Ladungsverhältnisse, im Golgilumen angereichert werden und mit dem Inhalt der Golgivesikel in die Milch gelangen.

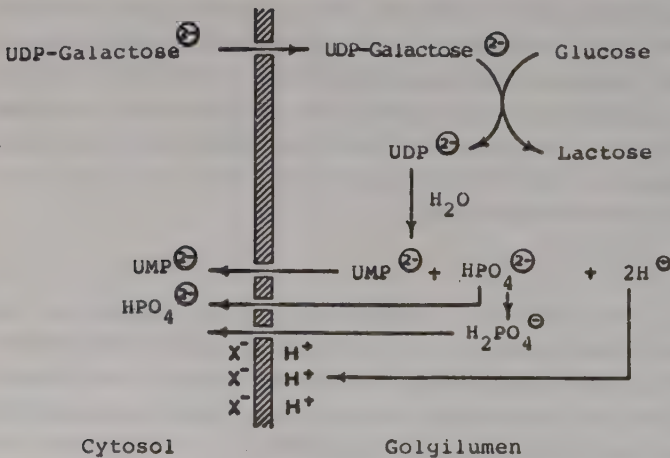


Abbildung 37: Die Entstehung von Protonen bei der Laktosesynthese (nach Kuhn et al., 1980)

Der steilere Anstieg der Orotsäureausscheidung bei den primiparen HF-Kühen gegenüber den multiparen HF-Kühen könnte auf einer größeren Stoffwechselbelastung der noch nicht voll entwickelten Milchdrüse dieser Tiere beruhen. Die multiparen Kühe haben bei gleicher Milchleistung mit einer größeren Milchdrüse auch eine bessere Blutversorgung (Glucose) des Euters. Auch Jesse et al. (1980) konnte bei primiparen Kühen höhere Orotsäurekonzentrationen in der Milch messen als bei multiparen Tieren.

Da sich bei den DF-Kühen die Orotsäureausscheidung im Vergleich zu den HF-Kühen bei höherer Milchleistung am deutlichsten unterschied, ist eine fütterungsbedingte Ursache für diesen Unterschied unwahrscheinlich (vgl. Abbildung 4). Möglicherweise liegt ein rassebedingter Unterschied zwischen DF- und HF-Kühen vor.

Nicht nur der Vergleich von Kühen mit verschiedenen Milchleistungen in der vorliegenden Untersuchung macht die Abhängigkeit der Orotsäureausscheidung über die Milch von der Milchleistung deutlich. Auch der Vergleich der Orotsäureausscheidung über die Milch mit der Laktationskurve (Abbildung 38, Jesse et al., 1980) zeigt, daß die Milchleistung die Orotsäureausscheidung maßgeblich bestimmt.

Die ansteigende Orotsäureausscheidung über die Milch mit zunehmender Milchleistung könnte auf den Glucosemangel (siehe 4.4.) in der Milchdrüsenzelle bei hoher Milchleistung zurückzuführen sein, weil der nächste Schritt in der Pyrimidinsynthese nach der Orotsäuresynthese, die Übertragung von Orotsäure auf Phospho-Ribosyl-

Pyrophosphat (PRPP), von der Verfügbarkeit von PRPP abhängt. Der intrazelluläre PRPP-Spiegel sinkt bei abnehmender Glucoseverfügbarkeit (Watts, 1980).

Eine niedrige Enzymaktivität der Orotat-Phosphoribosyl-Transferase, die durch Produkthemmung der in einem Enzymkomplex mit ihr verbundenen Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase durch UMP (Robinson und Larson, 1974) bedingt sein könnte, kann bei hohem Bedarf an Pyrimidinen die Ursache für einen Rückstau und eine Anreicherung der Orotsäure in der Milchdrüsenzelle sein.

Eine mögliche Änderung des Redoxpotentials in der Milchdrüsenzelle in Abhängigkeit von der Milchleistung könnte die Orotsäuresynthese beeinflussen, da bei der Oxidation des Dihydroorotats zum Orotat ein Reduktionsäquivalent in Form von $\text{NADH} + \text{H}^+$ gebildet wird.

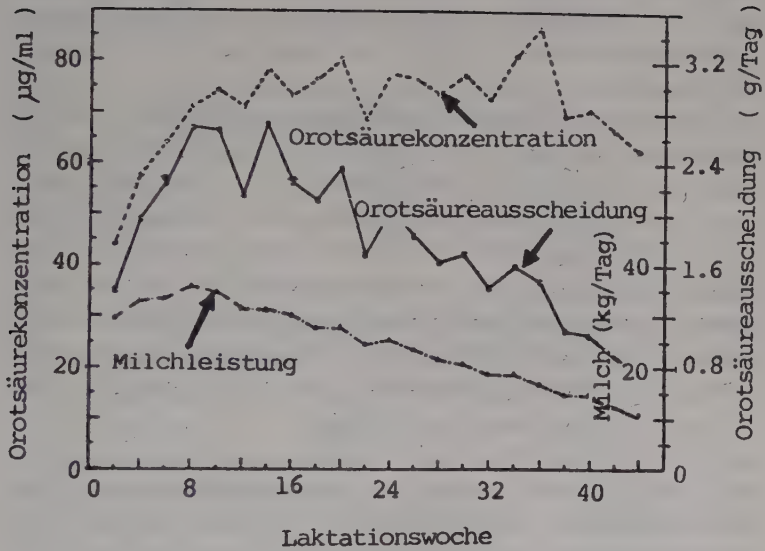


Abbildung 38: Durchschnittliche Orotsäurekonzentration, Orotsäureausscheidung und Milchleistung von acht Holstein-Friesian-Kühen in Abhängigkeit von der Laktationswoche (Jesse et al. 1980)

4.3. Zusammenhang zwischen Pyrimidin- und Purinmetaboliten der Milchdrüse

Die Korrelationen zwischen täglicher Ausscheidung von Orotsäure, Harnsäure und Uridin über die Milch in jeder möglichen Kombination deuten auf eine gemeinsame Ursache für den Anstieg ihrer Ausscheidung bei zunehmender Milchleistung hin.

Die zunehmende tägliche Harnsäureausscheidung über die Milch mit steigender Milchleistung ist möglicherweise auf eine verminderte Wiederverwertung vom Hypoxanthin unter Katalyse der Hypoxanthin-PRPP-Transferase (EC 2.4.2.8) zurückzuführen. Wie bei der Orotsäure diskutiert, könnte auch für die Wiederverwertung des Hypoxanthins die mangelnde PRPP-Verfügbarkeit limitierend sein. Hypoxanthin wird dann durch die Xanthin-Oxidase (EC 1.2.3.2) in der Milchdrüsenzelle oder nach der Sekretion in der Milch zu Harnsäure oxidiert.

Der Verlauf der Orotsäure- und Harnsäureausscheidung über die Milch in Abhängigkeit von der Milchleistung läßt für die Glucoseverfügbarkeit für die Pyrimidinsynthese einerseits und für die Purinwiederverwertung andererseits folgende Rückschlüsse zu. Bei einer Milchleistung zwischen 10 und 25 kg Milch pro Tag wird die Glucose in der Milchdrüsenzelle immer knapper. Orotsäure- und Harnsäureausscheidung steigen an. Bei einer Milchleistung von mehr als 25 kg pro Tag ist die Glucoseverfügbarkeit limitierend für die Milchleistung (für die Lactosesynthese). Der gleichbleibend niedrige Glucosespiegel in der Milchdrüsenzelle bewirkt gleichbleibend hohe Orot- und Harnsäureausscheidungen über die Milch.

Die höhere Harnsäureausscheidung mit der Milch bei den primiparen HF-Kühen könnte, wie für die Orotsäure diskutiert, eine Folge des kleineren Euters sein.

Vergleicht man die Pyrimidin- und Purinausscheidung in der Milch (siehe 3.4. Tabelle 22) dann der überragende Beitrag der Orotsäure deutlich. Demzufolge ist die Pyrimidinausscheidung 3.5 mal höher als die Purinausscheidung. Da Pyrimidine und Purine in den Nucleinsäuren nahezu in gleichen Anteilen vorkommen, kann dafür nur der Entzug der Pyrimidine in Form von CTP für die Cholinsynthese (Harper et al., 1975) oder der Entzug von UTP für die Lactosesynthese (vgl. Abbildung 39) entscheidend sein.

Bedenkt man, daß Pseudouridin in der Zelle überwiegend (zu 66%) in der rRNS vorkommt (Sander et al., 1984) und in dieser RNS-Form etwa mit einem Anteil von 1.6% (mol Pseudouridin / 100 mol Basen) vertreten ist (Hall, 1971) dann müßten bei einer Ausscheidung des Pseudouridins von 0.52 mmol/Tag (vgl. Tabelle 22) 16.25 mmol Purine (und ohne die Besonderheit der hohen Orotsäureausscheidung gleichviel Pyrimidine) täglich über die Milch abgegeben werden. Da bei denselben Tieren nur 3.95 mmol Purine täglich mit der Milch abgegeben werden, werden folglich 76% der abgebauten Purinverbindungen über den Salvage-Weg wiederverwertet. Die Wiederverwertung der Basen hängt von der Verfügbarkeit an PRPP ab, diese wiederum von der Verfügbarkeit an Glucose (Watts, 1980). Auch diese Kalkulation weist auf die Schlüsselfunktion der Glucose für den Pyrimidin- und Purinstoffwechsel der Rindermilchdrüse hin.

Monogastrier haben niedrigere Milchleistungen, mehr Glucose im Blut und niedrigere Ausscheidungen an Orotsäure (vgl. Tabelle 1).

4.4. Über die Schlüsselfunktion der Glucose im Stoffwechsel der Rindermilchdrüse

Für die Verknappung der Glucose in der Milchdrüse mit zunehmender Milchleistung sprechen folgende Literaturbefunde:

Daß Glucose ein essentielles Substrat für die Laktation ist, zeigten Versuche mit isolierten perfundierten Ziegeneutern, deren Milchleistung ohne Glucose im Nährmedium sofort abfiel (Hardwick et al., 1961).

Lactose ist für die Osmolarität der Milch von entscheidender Bedeutung. Nach Kirchmeier (1968) beträgt ihr Anteil an der Gefrierpunktserniedrigung der Kuhmilch 45%. Die Osmolarität der Milch muß der Osmolarität des Blutes entsprechen, da sonst das Milchdrüsengewebe geschädigt würde.

Die Lactosesynthese (vgl. Abbildung 39) und ihre Regulation wurde von Kuhn, Carrick und Wilde (1980) beschrieben.

Es gibt einige Hinweise dafür, daß die Verfügbarkeit an intrazellulärer Glucose für die Lactosesynthese limitierend ist. So konnte gezeigt werden, daß die Lactosesynthese isolierter Acini aus der Milchdrüse der Ratte linear mit der Glucosekonzentration im Medium bis zu 15 mmol/l Glucose zunahm (Kuhn et al., 1980).

Ein solcher langsamer Transportvorgang ist einerseits vom Konzentrationsgefälle vom Blut in die Zelle und andererseits vom Blutfluß durch die Milchdrüse abhängig. Aufgrund des mit zunehmender Milchleistung abnehmenden Blutflusses pro Kilogramm sezernierter Milch (vgl. Abbildung 36), könnte ein zunehmend stärkerer Glucosemangel der Milchdrüsenzelle mit ansteigender Milchleistung die Folge sein. Dieser Mangel an Glucose würde dann schließlich die Lactosesynthese und infolgedessen die Milchleistung begrenzen.

Glucose wird in der Milchdrüse des Rindes hauptsächlich für die Lactosesynthese und den Pentose-Phosphat-Zyklus verwendet. Geringere Mengen an Glucose werden in Glycerin und Citrat umgewandelt. Vernachlässigbar kleine Mengen werden in Fettsäuren umgewandelt (Forsberg et al., 1985).

4.5. Einflüsse auf die Allantoinkonzentration in der Milch

Eine Uricaseaktivität in der Milchdrüse bei Wiederkäuern ist nicht bekannt. Zudem weist die hohe Wiederfindungsrate von zu nativer Milch zugesetzter Harnsäure (siehe 2.4.3., Tabelle 7) darauf hin, daß auch in der Milch eine Urikaseaktivität, die durch mikrobielle Besiedlung bedingt sein könnte, nicht vorhanden ist. Das Allantoin der Milch kann folglich nur aus dem Blut stammen.

Kühe scheiden nur 6-7% des insgesamt gebildeten Allantoins über die Milch (Kirchgessner und Kreuzer, 1985) und 93-94% über den Harn aus. Bezogen auf den Blutfluß durch die Niere (6400 Liter Blut pro Tag für ein 650 kg schweres Rind, berechnet nach Vogel und Gärtner, 1976) und auf den Blutfluß durch die Milchdrüse (20 000 Liter Blut pro Tag bei einer Milchleistung von 30 kg Milch /Tag, siehe oben) erhält man eine mittlere Allantoinausscheidung von 0.3% pro 1000 l Blut über die Milchdrüse und von 14.6% pro 1000 l Blut über die Niere. Allantoin wird folglich über die Milch ca. 50 mal langsamer ausgeschieden als über den Harn. Wie oben erläutert, ist für die Allantoinausscheidung über die Milch der Blutfluß durch die Milchdrüse entscheidend. Die Konzentration des Allantoins in der Milch ist deshalb, wenn die Konzentration des Allantoins im Blut unverändert bleibt, zu dem Blutfluß durch die Milchdrüse pro Liter sezernierter Milch proportional.

Der Verlauf der Allantoinkonzentration in der Milch der Holstein-Friesian-Kühe in Abhängigkeit von der Milchleistung ist analog zum Verlauf des Blutflusses pro Liter

sezernierter Milch durch die Milchdrüse in Abhängigkeit von der Milchleistung (vgl. Abbildung 31). Die höhere Allantoinkonzentration in der Milch der Kühe mit niedriger Milchleistung ist bei einer von der Milchleistung unbeeinflussten Allantoinkonzentration im Blut auf einen höheren Blutfluß pro Liter sezernierter Milch bei niedrigeren Milchleistungen zurückzuführen.

Möglicherweise war das Futter der Holstein-Friesian-Kühe so energiereich, daß die obere Grenze der Synthesekapazität für mikrobielles Eiweiß im Pansen dieser Tiere erreicht war. Auch höhere Energiegaben mit steigendem Kraftfutteranteil für höhere Milchleistungen konnten die mikrobielle Proteinsynthese und damit die Purinsynthese im Pansen nicht mehr steigern. Nach Vercoe (1976) läßt sich die tägliche Allantoinausscheidung aus der über die Nahrung aufgenommenen verdaulichen organischen Substanz berechnen. Danach errechnet sich für die HF-Kühe bei einer Milchleistung von 15 kg/Tag eine tägliche Allantoinausscheidung von 176.6 mmol. Wenn 6% (Kirchgessner und Kreuzer, 1985) davon über die Milch ausgeschieden werden, dann sind dort 10.6 mmol/Tag zu erwarten. Der in der vorliegenden Untersuchung gemessene Wert von 11.39 mmol/Tag stimmt damit gut überein.

Bei den Deutsch-Fleckvieh-Kühen war die Konzentration des Allantoins in der Milch niedriger als bei den Holstein-Friesian-Kühen.

Dieser Unterschied war bei der Fütterung allein über das Grundfutter, das heißt bei niedriger Milchleistung (bis 15 kg/Tag) am größten. Bei diesem Leistungsniveau wirkt sich der unterschiedliche Energiegehalt der Grundfütterung (73 MJ NEL bei DF, 83 MJ NEL bei HF) am stärksten

aus. Mit zunehmender Milchleistung und damit verbundener ansteigender Kraftfutterzulage näherte sich die Konzentration des Allantoins in der Milch der Deutsch-Fleckvieh-Kühe der bei den Holstein-Friesian-Kühen an.

Da die mikrobielle Proteinsynthese im Pansen maßgeblich von der Energieversorgung abhängt (Kaplan und Pobirskii, 1974), hatten die Deutsch-Fleckvieh-Kühe mit zunehmenden Kraftfutterzulagen wahrscheinlich eine höhere ruminale mikrobielle Proteinsynthese. Die nucleinsäurenreichen Pansenmikroben wurden im Dünndarm verdaut und die Purinkörper absorbiert. Die Allantoinkonzentration im Blut ist als Folge der höheren mikrobiellen Proteinsynthese im Pansen mit zunehmender Milchleistung angestiegen. Dieser Einfluß hat die abnehmende Blutflußrate pro kg sezernierter Milch überdeckt. Die ansteigende Konzentration des Allantoins in Abhängigkeit von der Milchleistung in der Milch der Deutsch-Fleckvieh-Kühe ist die Folge einer angestiegenen Konzentration des Allantoins im Blut dieser Tiere.

4.6. Beurteilung des Hippursäuregehaltes der Milch

Hippursäure stammt aus dem Leberstoffwechsel. Es ist das Entgiftungsprodukt aus Benzoesäure und anderen Phenolen, die in Pflanzenmaterial vorkommen (Gatley und Sherrat, 1977). Durch Kopplung mit Glycin entsteht Hippursäure, die leichter wasserlöslich ist und folglich besser mit dem Urin ausgeschieden werden kann. Plasser (1985) fand in Magermilchpulvern durchschnittliche Hippursäuregehalte von 23.6 mg/100g im Sommer und von 16.3 mg/100g im Winter. Wenn man von einem Gehalt an Trockensubstanz in Magermilch von 8.9% ausgeht (Menke und Huss, 1975) entspricht dies einer Milchkonzentration von 117.2 μmol Hippursäure /l Milch im Sommer und von 81.0 μmol Hippursäure /l Milch im Winter. Der Unterschied zwischen "Wintermilch" und "Sommermilch" ist auf einen Unterschied in der Fütterung zurückzuführen, wobei der hohe Benzoesäuregehalt des Futtergrases von entscheidender Bedeutung ist. Der in der vorliegenden Untersuchung gefundene Hippursäuregehalt von 75 $\mu\text{mol/l}$ Milch entspricht den von Plasser gefundenen Werten für die Winterzeit. Dies erklärt sich aus der ganzjährigen Silagefütterung der Holstein-Friesian- und Fleckviehkühe, die einer üblichen Winterfütterung entspricht.

4.7. Schlußfolgerung

Stellt man die Frage nach dem Sinn der zunehmenden Orot- und Harnsäureausscheidung mit ansteigender Milchleistung, das heißt nach dem Selektionsvorteil in der Evolution, dann bieten sich eine Reihe von Antworten an.

Beim Wiederkäuer wird im Blutplasma die Glucosekonzentration niedrig gehalten, damit in allen Geweben bevorzugt Acetat verstoffwechselt wird (Giesecke, mündliche Mitteilung).

Zur Aufrechterhaltung einer hohen Milchsynthese ist es günstiger, Pyrimidin- und Purinkörper nicht wiederzuverwenden und die knappe Glucose für die Lactosesynthese und Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten zu sparen.

Der Anstieg der Orotsäureausscheidung und der Harnsäureausscheidung in Abhängigkeit von der Milchleistung zeigen, daß der bei hoher Leistung größere Glucosemangel eine Wiederverwertung der Pyrimidine und Purine über den Salvage-Weg möglicherweise verhindert. Damit steigt gleichzeitig die Abgabe von wertvollen Bestandteilen über die Milch. Harnsäure hat als Antioxidans und Radikalfänger (Ames et al., 1981) und Orotsäure durch die Hemmung der hepatischen Cholesterinsynthese (Dull et al., 1983), die Steigerung der Phagozytoseaktivität von Leukozyten, die Stimulierung des Heilungsprozesses und viele andere (Cihak, 1980) positive Wirkungen für das Kalb oder den Menschen.

Für die Tierzucht ist zu empfehlen, solche Kühe zu selektieren, die bei hoher Milchleistung eine geringe Orotsäureausscheidung aufweisen, da bei ihnen wahrscheinlich eine bessere Versorgung des Euters mit Glucose erfolgt.

Die Messung der Allantoins in der Milch könnte für die Beurteilung der Proteinverdaulichkeit, die Bestimmung der Hippursäure für die Beurteilung der Rohfaserverdaulichkeit interessant sein.

Über die Bestimmung der seltenen Basen in der Milch kann, wenn ihre Herkunft aus der Milchdrüse gesichert ist, der Nucleinsäureumsatz für die Proteinbiosynthese berechnet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Um bei Rindern etwas über die Art und Menge der Pyrimidin- und Purinmetaboliten, die über die Milch ausgeschieden werden zu erfahren, wurde eine HPLC-Methode zur gleichzeitigen Bestimmung aller Pyrimidine und Purine in der Milch entwickelt. Der Vergleich von Milchproben von Holstein-Friesian-Kühen (HF) und Deutsch-Fleckvieh-Kühen (DF) sollte zur Unterscheidung von Rasse-Eigenheiten gegenüber grundsätzlichen physiologischen Vorgängen dienen. Der Einfluß der Milchleistung auf die Ausscheidung von Pyrimidin- und Purinmetaboliten über die Milch sollte untersucht werden. Dabei ließen sich folgende Ergebnisse erzielen:

1. Die Orotsäure- und Harnsäureausscheidungen stiegen in Abhängigkeit von der Milchleistung bei niedrigen Leistungen bis zu 25 kg/Tag an. Der Anstieg war bei primiparen HF-Kühen signifikant steiler als bei multiparen HF-Kühen. Kühe mit hohen Milchleistungen (über 25 kg/Tag) schieden gleichbleibende Orotsäure- und Harnsäuremengen über die Milch aus. HF-Kühe schieden signifikant mehr Orotsäure über die Milch aus als DF-Kühe.

2. Die Uridinausscheidung stieg mit steigender Milchleistung signifikant an. Der Anstieg war bei den primiparen Tieren signifikant steiler als bei den multiparen Tieren.

3. Die Konzentration des Allantoins war bei HF-Kühen höher als bei DF-Kühen. Die untersuchten DF-Kühe hatten ansteigende Allantoinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Milchleistung. Dies konnte auf eine bessere Energieversorgung der Pansenmikroben mit steigenden Kraftfuttergaben zurückgeführt werden.

4. Keine Abhängigkeit von der Milchleistung war bei den Konzentrationen von Pseudouridin (3.3 $\mu\text{mol/l}$), Cytidin (6.6 $\mu\text{mol/l}$), Hypoxanthin (7.5 $\mu\text{mol/l}$) und Xanthin (1.3 $\mu\text{mol/l}$) in der Milch vorhanden.

5. Einige seltenen Nucleoside (Pseudouridin, 5-Methyl-Cytidin, 5-Methyl-Desoxycytidin, 1-Methyl-Inosin) und seltene Basen (7-Methyl-Guanin, 2-Methyl-Guanin) wurden in der Milch von HF-Kühen qualitativ und in der Milch von DF-Kühen quantitativ nachgewiesen.

Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf den Pyrimidin-, Purin- und Glucosestoffwechsel der Milchdrüse und den Energiestoffwechsel der Pansenmikroben des Rindes diskutiert.

SUMMARY

INVESTIGATIONS ON THE INFLUENCE OF MILK YIELD ON THE METABOLISM OF PYRIMIDINES AND PURINES IN BOVINE MAMMARY GLAND

In order to quantify the type and amount of pyrimidine and purine metabolites which are excreted in bovine milk an HPLC method for the simultaneous determination of all pyrimidines and purines in milk was developed. The comparison of milk samples from Holstein-Friesian cows (HF) and Deutsch-Fleckvieh cows (DF) should serve to distinguish the influence of breed or physiological processes. The influence of milk yield on the excretion of pyrimidine and purine metabolites in bovine milk were investigated. The following results were obtained:

1. The excretion of orotic and uric acid in milk increased as milk yield increased up to 25 kg/day. This increase was significantly steeper in primiparous HF-cows than in multiparous HF-cows. Cows with higher milk yield (over 25 kg/day) excreted constant amounts of orotic and uric acid. HF-cows secreted significantly more orotic acid in milk than DF-cows.
2. Uridine excretion in milk increased significantly with increasing milk yield. The increase was significantly steeper in primiparous than in multiparous animals.

3. The concentration of allantoin was higher in the milk of HF-cows than in DF-cows. DF-cows had increasing allantoin concentrations in milk dependent on milk yield. This could be explained by better energy supply for the rumen microorganisms with increasing feed supplements.

4. Pseudouridine ($3.3 \mu\text{mol/l}$), cytidine ($6.6 \mu\text{mol/l}$), hypoxanthine ($7.5 \mu\text{mol/l}$) and xanthine ($1.3 \mu\text{mol/l}$) concentrations in milk were not dependent on milk yield.

5. Several different modified nucleosides (pseudo-uridine, 5-methyl-cytidine, 5-methyl-deoxycytidine, 1-methyl-inosine) and nucleobases (7-methyl-guanine, 2-methyl-guanine) were demonstrated qualitatively in the milk of HF-cows and quantitatively in the milk of DF-cows.

The results were discussed with regard to pyrimidine, purine and glucose metabolism in the mammary gland and energy metabolism of rumen microorganisms in cows.

LITERATURVERZEICHNIS

- AHMED, A.A., G.A. PORTER und R.D. MCCARTHY, 1978
Isolation, quantification, and biosynthetic origin
of orotic acid in milk
J. Dairy Sci., 61, 39-43
- AMES, B.N., R. CATHCART, E. SCHWIERS und P. HOCHSTEIN, 1981
Uric acid provides an antioxidant defense in humans
against oxidant- and radical-caused aging and
cancer: a hypothesis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6858
- BHAVADASAN, M.K. und N.C. GANGULI, 1980
Free and membrane-bound xanthine oxidase in bovine
milk during cooling and heating
J. Dairy Sci., 63, 362-367
- BHAVADASAN, M.K., M.J. ABRAHAM und N.C. GANGULI, 1982
Influence of agitation on milk lipolysis and release
of membrane-bound xanthine oxidase
J. Dairy Sci., 65, 1692-1695
- BICKERSTAFFE, R., E.F. ANNISON, und J.L. LINZELL, 1974
The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino
acids in lactating dairy cows
J. agr. Sci., Camb., 82, 71-85

BISCARO, G. und E. BELLONI, 1905

Über einen neuen Bestandteil in der Milch. Über die
Orotsäure.

Chemisches Zentral-Blatt, 76, 63

BRADLEY, P. L. und M. GUNTHER, 1960

The xanthine oxidase of human milk and colostrum
Biochem. J., 74, 15P

BRAY, R. C., 1975

Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and
related enzymes.

In: The Enzymes, Vol. XII, 299-419

BRILEY, M. S. und R. EISENTHAL, 1974

Association of xanthine oxidase with the bovine
milk-fat-globule membrane

Catalytic properties of the free and membrane-bound
enzyme

Biochem. J., 143, 149-157

BRILEY, M. S. und R. EISENTHAL, 1975

Association of xanthine oxidase with the bovine
milk-fat-globule membrane

Nature of the enzyme-membrane association

Biochem. J., 147, 417-423

CERBULIS, J. und H. M. FARRELL, jr., 1977

Xanthine oxidase activity in dairy products

J. Dairy Sci., 60, 170-176

CHEN, M.-H. und B.L.LARSON, 1971

Pyrimidine synthesis pathway enzymes and orotic acid
in bovine mammary tissue

J.Dairy Sci., 54, 842-846

CIHAK, A. und W.REUTTER, 1980

Orotic acid

MTP Press Limited, Lancaster

COHEN, S.N., 1985

Genmanipulation in: Erbsubstanz DNA: vom genetischen
Code zur Gentechnologie

Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft,
Heidelberg

DEMOTT, B.J. und O.A.PRAEPANITCHAI, 1978

Influence of storage, heat, and homogenization upon
xanthine oxidase activity of milk

J.Dairy Sci., 61, 164-167

DENAMUR, R., G.FAUCONNEAU und G.GUNTZ, 1959

Acid soluble nucleotides in the milk of the ewe,
cow, goat and sow

Revista Espanola de Fisiologia, 15, 301-310

DLG Futterwerttabellen für Wiederkäuer, 1982

5. Auflage, DLG - Verlag, Frankfurt am Main

DOCUMENTA GEIGY, 1968

Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage

Redaktion: K.Diem und C.Leutner

Hrsg.: J.R. Geigy AG; Pharma, Basel

DULL,B.J., R.D.McCARTHY und A.KILARA, 1983

The modulating effect of an inhibitor of cholesterolgenesis present in bovine milk upon the synthesis of cholesterol, dolichol and ubiquinone
Atherosclerosis,49,231-239

DURSCHLAG,R.P. und J.L.ROBINSON, 1980 a

Spezies specifity in the metabolic consequences of orotic acid consumption
J.Nutr.,110,822-828

DURSCHLAG,R.P. und J.L.ROBINSON, 1980 b

Orotic acid content of infant formulas
Am.J.Clin.Nutr.,33,2192-2193

EBNER,K.E., E.C.HAGEMAN und B.L.LARSON, 1961

Functional biochemical changes in bovine mammary cell cultures
Exptl.Cell Research,25,555-570

EHLE,F.R., J.L.ROBINSON,J.H.CLARK und C.R.BAUMRUCKER, 1981

Effect of amino acid concentration on orotic acid production by bovine mammary tissue
J.Dairy Sci.,64,2192-2196

FORSBERG,N.E., R.L.BALDWIN und N.E.SMITH, 1984

Roles of acetate and its interactions with glucose
and lactate in cow mammary tissue
J.Dairy Sci.,67,2247-2254

FORSBERG,N.E., R.L.BALDWIN und N.E.SMITH, 1985

Roles of glucose and its interaction with acetate in
maintenance and biosynthesis in bovine mammary
tissue
J.Dairy Sci.,68,2544-2549

GANDHI,M.P.S. und S.P.AHUJA, 1979

Partial characterization of xanthine oxidase from
buffalo milk fat globules and variation in the
xo content of milk
Zbl.Vet.Med.A,26,765-769

GATLEY,S.J. und H.S.A.SHERRATT, 1977

The synthesis of hippurate from benzoate and glycine
by rat liver mitochondria
Biochem.J.,166,39-47

GIESECKE,D., W.KRAFT und W.TIEMEYER, 1985

Warum Dalmatiner Harnsäure ausscheiden
Ursachen und Folgen einer klassischen Stoffwechsel-
anomalie
Tierärztl.Prax.,13,331-341

GRUMMER, M.A. und B.L. LARSON, 1981

Subcellular localization of pyrimidine synthesis
enzymes in bovine mammary tissue
J.Dairy Sci., 64, 526-532

HALL, R.H., 1971

The modified nucleosides in nucleic acids
Columbia University Press, New York, London

HARDWICK, D.C., J.L. LINZELL und S.M. PRICE, 1961

The effect of glucose and acetate on milk secretion
by the perfused goat udder.
Biochem.J., 80, 37-45

HARPER, H.A., G. LÖFFLER, P.E. PETRIDES, L. WEISS, 1975

Physiologische Chemie
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

JARASCH, E.D., G. BRUDER, T.W. KEENAN und W.W. FRANKE, 1977

Redox constituents in milk fat globule membranes and
rough endoplasmic reticulum from lactating mammary
gland
J.Cell Biol., 73, 223-241

JESSE, B.W., C.R. ANDERSON und J.L. ROBINSON, 1980

Bovine milk orotate: differences between cows and
changes during lactation
J.Dairy Sci., 63, 235-242

JOHKE, T. und T.GOTO, 1962

Acid soluble nucleotides in cow's and goat's milk
J.Dairy Sci., 45, 735-741

KANO-SUEOKA, T., 1983

Factors affecting mammary cells in culture
In: Biochemical actions of hormones vol X.
Academic Press. Inc.

KAPLAN, V.A. und N.N.POBIRSKII, 1974

Purine metabolism in ruminants
Sel'skochozjaistvennaja Biologija, 9(1), 91-95

KAPLAN, V.A. und N.N.POBIRSKII, 1975

Purine metabolism in ruminants
Nutr. Abstr. Rev., 45, 281-282

KEENAN, T.W., und D.P.DYLEWSKI, 1979

Symposium: Nutrient Uptake across the Mammary Gland
Aspects of Intracellular Transit of Serum and Lipid
Phases of Milk
J.Dairy Sci., 68, 1025-1040

KIRCHMEIER, 1968

Eigenschaften der Milch. In: Handbuch der Lebensmittelchemie, Dritter Band, Teil 1
Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York

KRONFELD, D.S., RAGGI, F. und C.F. RAMBERG, 1968

Mammary blood flow and ketone body metabolism in normal, fasted and ketotic cows

American Journal of Physiology, 215, 218-227

KUHN, N.J., und A. WHITE, 1977

The Role of Nucleoside Diphosphatase in a Uridine Nucleotide Cycle Associated with Lactose Synthesis in Rat Mammary- Gland Golgi Apparatus

Biochem. J., 168, 423-433

KUHN, N.J., D.T. CARRICK und C.J. WILDE, 1980

Symposium: Milk synthesis

Lactose synthesis: The possibilities of regulation

J. Dairy Sci., 63, 328-336

LAARVELD, B., D.A. CHRISTENSEN und R.P. BROCKMAN, 1981

The effect of insulin on net metabolism of glucose and amino acids by the bovine mammary gland

Endocrinology, 108, 2217-2221

LARSON, B.L., 1976

Comparative production of β -lactoglobulin and orotic acid with lactose in bovine mammary cell cultures: effects of cell density and constituent inhibition

J. Dairy Sci., 59, 1881-1889

LARSON, B.L. und H.M. HEGARTY, 1979

Orotic acid in milks of various species and commercial dairy products

J.Dairy Sci., 62, 1641-1644

LAURENT, F. und B. VIGNON, 1983

Veränderungsfaktoren der Allantoinausscheidung bei Schafen und Ziegen

Arch.Tierernährung, Berlin, 33(9), 671-681

MATHER, I.H., K.WEBER und T.W. KEENAN, 1977

Membranes of mammary gland XII

Loosely associated proteins and compositional heterogeneity of bovine milk fat globule membrane

J.Dairy Sci., 60, 394-402

MATHER, I.H., C.H. SULLIVAN und P.J. MADARA, 1982

Detection of xanthine oxidase and immunologically related proteins in fractions from bovine mammary tissue and milk after electrophoresis in polyamide gels containing sodium dodecyl sulphate

Biochem.J., 202, 317-323

MENKE, K.-H., und W. HUSS, 1975

Tierernährung und Futtermittelkunde

Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

MODI,V.V., E.C.OWEN und R.PROUDFOOT, 1959

Species differences in the occurrence of xanthine oxidase in milk

Proc.Nutr.Soc.,18,1

MOTYL,T., W.BAREJ und H.LEONTOWICZ, 1986

The orotic acid concentration in the blood, milk, and urine of dairy cows fed with urea supplemented diet

Arch.Anim.Nutr.,36,No.6,551-556

NASS,G., 1986

Ausscheidung von Nucleinsäure-Metaboliten als Krebstest

Naturwiss.Rundsch.,39(2),67-70

PETERS,G.J. und J.H.VEERKAMP, 1983

Mini-review

Purine and pyrimidine metabolism in peripheral blood lymphocytes

Int.J.Biochem.,15,115-123

PLASSER,A.J., 1985

Nichtproteinstickstoff-Komponenten der Milch als analytische Indikatoren in Lebensmitteln

Dissertation,TU München

RASHID, R., 1976

Acid-soluble purine and pyrimidine derivatives in cow's milk produced on normal feed and almost protein-free-feed with urea as the main nitrogen source

Die Nahrung, 20(10), 875-882

ROBERT, L. und J. POLONOVSKI, 1955

Activation and inactivation of milk xanthine oxidase by physicochemical means

Discuss. Faraday Soc., 20, 54-65

ROBINSON, J. L. und B. L. LARSON, 1974

Nucleotide inhibition of post-orotate pyrimidine synthesis pathway enzymes of bovine mammary tissue

J. Dairy Sci., 57, 1410-1413

ROBINSON, J. L., 1980

Bovine Milk Orotic Acid: Variability and Significance for Human Nutrition

J. Dairy Sci., 63, 865-871

ROBINSON, J. L., D. B. DOMBROWSKI, J. H. CLARK und R. D. SHANKS, 1984

Orotate in Milk and Urine of Dairy Cows with a Partial Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase

J. Dairy Sci., 67, 1024-1029

SACHS, L., 1984

Angewandte Statistik

6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

SANDER, G., G.HELLER-SCHÖCH, J.WIELAND, H.TOPP und G.SCHÖCH, 1984

RNA catabolites in urine as measure for turnover of tRNA, mRNA and rRNA

In: Metabolism and enzymology of nucleic acid Vol.5
Slovak Academy of Sciences, Bratislava

SCHREIBER, G., 1984

Purinmetaboliten im Serum verschiedener Primaten
Vet. Med. Diss., München

SMITH, R.H., 1969

Reviews of the progress of dairy science

Section G.General, Nitrogen metabolism and the rumen
J.Dairy Res., 36, 313-331

STANDERFER, S.B. und P.HANDLER, 1955

Fatty liver induced by orotic acid feeding
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 90, 270-271

STANNARD, D.J., 1975

The use of marker enzymes to assay the churning of milk

J.Dairy Res., 42, 241-246

SCHÖCH, G., G.HELLER-SCHÖCH, H.LORENZ, H.BAISCH, M.WESER,
W.LEIFER und R.GRÜTTNER, 1977

Die Ausscheidung von Nucleinsäurenabbauprodukten in
Abhängigkeit von Lebensalter und Wachstum

Mschr.Kinderheilk., 125, 542-543

SCHÖCH, G., M.GABRECHT, HELLER-SCHÖCH, H.BAISCH und
W.LEIFER, 1979

Die Ausscheidung von normalen und modifizierten
Nucleobasen im Urin bei chronischen myeloprolifer-
ativen Syndromen

Blut, 38, 391-396

SCHÖCH, G., G.HELLER-SCHÖCH, J.MÜLLER, P.CLEMENS,
A.HOLTGREWE und M.HEDDRICH, 1983

Die Ausscheidung normaler und modifizierter RNA-
Kataboliten sowie von Kreatinin im Urin in Abhängig-
keit von der Ernährung bei Kindern

Monatsschr.Kinderheilkd., 131, 259-263

SCHWENDT, G., 1979

Chromatographische Trennmethoden

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

SIEBER, R., 1983

Über das Vorkommen der Xanthinoxidase sowie den
Einfluß milchtechnologischer Verfahren auf die
Xanthinoxidase-Aktivität der Kuhmilch - eine
Übersicht

Schweiz.Landw.Fo., 22 (3/4), 105-123

TIEMEYER, W. und D.GIESECKE, 1982

Quantitative determination of allantoin in biological fluids by reversed-phase high-pressure liquid chromatography

Anal.Biochem., 123, 11-13

TIEMEYER, W., M.STOHRER und D.GIESECKE, 1984

Metabolites of nucleic acids in bovine milk

J.Dairy Sci., 67, 723-728

TOPPS, J.H. und R.C.ELLIOT, 1965

Relationship between concentration of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep

Nature, 205, 498-499

VEKICH, A.J., J.L.ROBINSON und B.L.LARSON, 1973

Carbamylphosphate Synthetase of Lactating Bovine Mammary Tissue

Biochem.Biophys.Res.Comm., 55, 1298-1304

VERCOE, J.E., 1976

Urinary allantoin excretion and digestible dry-matter intake in cattle and buffalo

J.agric.Sci., Camb., 86, 613-615

VOGEL, G. und K.GÄRTNER, 1976

Physiologie der Niere; Wasser- und Elektrolyt-
haushalt

In: Lehrbuch der Veterinärphysiologie

A.Scheunert/A.Trautmann ed.

Paray-Verlag, Berlin und Hamburg

WATTS, R.W.E., 1980

Biochemical aspects of nucleic acid metabolism.

In: Proc. 3rd EAAP-Symposium on Protein Metabolism
and Nutrition. Oslage, H.J.; Rohr, U., (eds.).

European Association for Animal Production Publ., 28,
103-119

WATTS, R.W.E., 1981

Purine metabolism

Biochem.Soc.Transact., 9, (1), 3-5

ZIKARIS, J.P., S.J.RZUCIDLO und N.O.BIASOTTO, 1977

Persistence of bovine milk xanthine oxidase activity
after gastric digestion in vivo and in vitro

J.Dairy Sci., 60, 533-541

ZIKARIS, J.P. und S.C.WOOTERS, 1980

Activity of xanthine oxidase in dairy products

J.Dairy Sci., 63, 893-904

Besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. D. Giesecke für die Überlassung des Themas, die stets gern gewährte Unterstützung und die Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. W.Tiemeyer danke ich für die Einführung in die HPLC-Analytik.

Allen Mitarbeitern des Labors, Frau S.Wiesmayr, Frau G.Loibl, Frau S.Lutz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit. Herrn Priv. Doz. Dr.Dr. M.Stanggassinger und Herrn Dr. N.Sandner danke ich für Ihre Diskussionsbereitschaft.

Den Herren Prof. Dr. J. Meyer vom Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim und Herrn Steuer vom Staatlichen Versuchsgut Achselschwang danke ich für ihre freundliche Hilfe bei der Milchprobennahme.

LEBENS LAUF

Manfred Stohrer	geb. am 2.1.1958 in Göppingen
Eltern	Karl Stohrer, Maurermeister und Maria Stohrer, geb. Bühler
April 1965	Eintritt in die Volksschule in Uhingen
September 1968	Eintritt in das Hohenstaufen - Gymnasium in Göppingen
Mai 1977	Ablegen der Reifeprüfung
Wehrdienst	Juli 1977 bis September 1978
November 1978	Aufnahme des Studiums der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
März 1981	Beginn der Doktorarbeit
Dezember 1983	Staatsexamen
November 1983 - Oktober 1984	Stipendiat der Stiftung "Wilhelm- Stepp-Preis"
seit November 1984	vollbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiolo- gie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie

